

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



**Srovnání vlastností buněčných linií rezistentních k ellipticinu,
doxorubicinu a cisplatině**

The comparison of properties of cell lines resistant to ellipticine, doxorubicin, and cisplatin

Bc. Tereza Černá

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Jitka Poljaková, Ph.D.

PRAHA, 2014

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Jitky Poljakové, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří se podíleli a stále podílejí na mé cestě za vzděláním. Předně bych chtěla upřímně poděkovat své školitelce RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení, cenné rady, ochotu a všestrannou pomoc, kterou mi během spolupráce věnovala.

Můj velký dík patří i RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. a RNDr. Ivetě Mrízové za objasnění experimentálních přístupů. Oběma děkuji za předání rad a zkušeností, za jejich ochotu a čas. Dále chci poděkovat celé laboratoři 219 za vytvoření příjemných pracovních podmínek.

V neposlední řadě děkuji rodině a blízkým, kterým vděčím za dlouhodobou podporu, pochopení a trpělivost.

Obsah

Obsah.....	4
Abstrakt	6
Abstract	7
Seznam použitých zkratk.....	8
1. Úvod.....	11
1.1. Normální růst buňky a maligní transformace	11
1.1.1. Fáze kancerogeneze.....	12
1.1.2. Znaky nádorových buněk	13
1.2. Neuroblastom.....	15
1.2.1. Genetické změny u neuroblastomu	16
1.2.2. Klinická stadia neuroblastomu	18
1.2.3. Léčba neuroblastomu	18
1.3. Protinádorová chemoterapie	19
1.3.1. Mechanismus účinku cytostatik	20
1.3.2. Ellipticin.....	21
1.3.3. Doxorubicin.....	23
1.3.4. Cisplatina.....	23
1.4. Nádorová rezistence	24
1.4.1. Cytochromy P450.....	24
1.4.2. Cytochrom b ₅	26
1.4.3. Protein p53	27
1.4.4. Retinoblastomový protein	28
1.4.5. RAS	29
2. Cíl práce	30
3. Materiál a metody.....	31
3.1. Materiál.....	31
3.1.1. Biologický materiál	31
3.1.2. Chemikálie	31
3.1.3. Další materiál	34
3.2. Metody.....	34
3.2.1. Rozmrazení buněk.....	34
3.2.2. Kultivace buněk.....	34

3.2.3.	Pasážování buněk	34
3.2.4.	Příprava vzorků buněčných linií	35
3.2.5.	Izolace proteinů z buněčných pelet	36
3.2.6.	Stanovení proteinů.....	37
3.2.7.	SDS elektroforéza	37
3.2.8.	Western blot	38
3.2.9.	Izolace RNA.....	39
3.2.10.	Agarosová elektroforéza.....	40
3.2.11.	Reverzní transkripce	41
3.2.12.	Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR)	41
4.	Výsledky.....	43
4.1.	Western blot.....	43
4.1.1.	Detekce hladiny proteinu p53	43
4.1.2.	Detekce hladiny retinoblastomového proteinu.....	46
4.1.3.	Detekce hladiny RAS	49
4.1.4.	Detekce hladiny cytochromů P450 1A1, 2D6 a 3A4 a cytochromu b ₅	51
4.2.	Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR)	52
4.2.1.	Stanovení exprese genu p53	55
4.2.2.	Stanovení exprese genu pRb	57
4.2.3.	Stanovení exprese genu H-RAS.....	59
4.2.4.	Stanovení exprese genu CYP 1A1	61
4.2.5.	Stanovení exprese genu CYP 2D6	61
5.	Diskuze.....	63
6.	Závěr.....	66
	Literatura	67

Abstrakt

Neuroblastom je nejčastější solidní extrakraniální nádor dětského věku. I přes veškeré pokroky v onkologické diagnostice a terapii je léčba některých forem neuroblastomu stále obtížná. Jednou z největších komplikací chemoterapie je vznik lékové rezistence.

Tato práce se zabývá vlivem cytostatik na expresi vybraných proteinů, které se mohou podílet na chemorezistenci lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 na proteinové úrovni i na úrovni genové exprese. Senzitivní linie UKF-NB-4 a od ní odvozené rezistentní linie UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} byly vystaveny působení cisplatiny, doxorubicinu nebo ellipticinu po dobu 24, 48 a 72 hodin.

Metodou Western blot bylo prokázáno, že cytostatika cisplatina, doxorubicin nebo ellipticin podaná senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 v množstvích, která jsou přidávána do kultivačního média rezistentních neuroblastomových linií pro udržování rezistence, indukují po 72 hodinové kultivaci v této buněčné linii expresi proteinu p53 a zároveň snižují množství retinoblastomového proteinu pRb. Rozdíly v expresi proteinu RAS, cytochromů P450 1A1, 3A4 a cytochromu b₅ nebyly prokázány. Změny v expresi studovaných proteinů u rezistentních linií UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} kultivovaných s a bez přidavku daného cytostatika nejsou metodou Western blot detekovatelné.

Na úrovni genové exprese pomocí metody RT-PCR byla u senzitivní neuroblastomové linie UKF-NB-4 pozorována nižší hladina p53 po 72 hodinovém vystavení buněk cisplatině nebo doxorubicinu, zatímco kultivace buněčné linie s ellipticinem množství p53 neovlivnila. Naopak kultivace neuroblastomové buněčné linie rezistentní k cisplatině s cisplatinou hladinu p53 zvýšila. Množství pRb na úrovni genové exprese odpovídalo po 48 hodinové kultivaci senzitivní neuroblastomové linie UKF-NB-4 s cytostatiky hladinám pRb detekovaným na proteinové úrovni po 72 hodinové kultivaci buněčné linie s cytostatiky. 48 hodinová kultivace UKF-NB-4 s cisplatinou nebo doxorubicinem snížila hladinu genové exprese H-RAS a cytochromu P450 2D6, přestože na proteinové úrovni nebyl rozdíl v expresi RAS proteinu patrný a cytochrom P450 2D6 se na proteinové úrovni nepodařilo detekovat vůbec.

Právě pochopení mechanismů odpovědných za vznik chemorezistence na genové a proteinové úrovni je rozhodující pro léčbu nádorových onemocnění.

Klíčová slova: neuroblastom, tkáňové kultivace, Western blot, RT-PCR, cisplatina, doxorubicin, ellipticin, p53, pRb, RAS, cytochromy P450, cytochrom b₅

Abstract

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor of childhood. Despite advances in cancer diagnosis and therapy, the treatment of some forms of neuroblastoma is still complicated. One of the major complications of the chemotherapy is a developed drug resistance.

This master thesis deals with the effect of cytostatics on protein and gene expression of selected proteins, which may contribute to chemoresistance of the human neuroblastoma cell line UKF-NB-4. The sensitive line UKF-NB-4 and the resistant line UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} and UKF-NB-4^{ELLI} were exposed to cisplatin, doxorubicin, ellipticine for 24, 48 and 72 hours.

The Western blot analysis showed that cytostatic agents cisplatin, doxorubicin or ellipticine added to the sensitive neuroblastoma cell line UKF-NB-4 in amounts which are added to resistant neuroblastoma cell lines in order to maintain resistance induced expression of p53 and reduced expression of retinoblastoma protein pRb after 72 hours of cultivation. Differences in the expression of RAS protein, cytochrome P450 1A1, 3A4 and cytochrome b₅ has not been shown. Changes in the expression of the studied proteins in resistant lines UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} and UKF-NB-4^{ELLI} cultured with and without cytostatic agents were not detected by the Western blot analysis.

Lower level of the p53 gene was detected in the sensitive neuroblastoma cell line UKF-NB-4 after 72 hour cultivation with cisplatin or doxorubicine using RT-PCR while no effect of ellipticine on the p53 gene was detected. Conversely, cultivation of neuroblastoma cell lines resistant to cisplatin with cisplatin increased the level of the p53 gene. The gene expression of pRb after 48 hours cultivation of the sensitive neuroblastoma line UKF-NB-4 with cytostatics corresponded to the pRb levels after 72 hours cultivation of the cell line with cytostatics detected by the Western blot analysis. Lower levels of the H-RAS and cytochrome P450 2D6 gene expression were detected in the UKF-NB-4 cell line cultivated with cisplatin or doxorubicin for 48 hours, however there was no difference in the expression of the RAS protein and cytochrome P450 2D6 was not detected by the Western blot.

The knowledge of the mechanisms responsible for chemoresistance at gene and protein level is crucial for cancer treatment.

Keywords: neuroblastoma, tissue culture, Western blot, RT-PCR, cisplatin, doxorubicin, ellipticine, p53, pRb, RAS, cytochrome P450, cytochrome b₅ (In Czech)

Seznam použitých zkratek

ALK	- z angl. „ <i>Ana-plastic lymphoma kinase</i> “
APS	- persíran amonný
ATP	- adenosintrifosfát
B2M	- z angl. „ <i>Beta-2 microglobulin</i> “
BCA	- bicinchoninová kyselina
BCIP/NBT	- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/p-nitroblue tetrazolium chlorid (chromogen alkalické fosfatasy)
Bcl-2	- z angl. „ <i>B-cell lymphoma 2</i> “
BDNF	- z angl. „ <i>Brain derived neurotrophic factor</i> “
BIRC5	- survivin (z angl. „ <i>Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5</i> “)
BIS	- N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	- hovězí sérový albumin (z angl. „ <i>Bovine serum albumin</i> “)
CDDP	- cisplatina
CDK	- cyklin-dependentní kinasy
CDKi	- inhibitory cyklin-dependentních kinas
CDKN2A	- z angl. „ <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> “
cDNA	- komplementární deoxyribonukleová kyselina
COX-2	- celecoxib
CYP	- cytochrom P450
DG-2	- disialogangliosid
DM	- z angl. „ <i>Double minutes chromatin bodies</i> “
DMSO	- dimethylsulfoxid
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
DOXO	- doxorubicin
E2F	- E2 transkripční faktor
EDTA	- ethylendiamintetraoctová kyselina
ELLI	- ellipticin
FBS	- fetální hovězí sérum
G ₀ -fáze	- klidová fáze buněčného cyklu
G ₁ -fáze	- růstová/přípravná/postmitotická fáze buněčného cyklu (z angl. „ <i>Growth</i> “)

GAP	- z angl. „ <i>GTPase-Activating Protein</i> “
GD2	- povrchový disialogangliosid
GDP	- guanosindifosfát
GEF	- z angl. „ <i>Guanine nucleotide exchange factor</i> “
GTP	- guanosintrifosfát
HIV	- virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. „ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> “)
H-RAS	- z angl. „ <i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i> “
HSR	- z angl. „ <i>Homogenously staining regions</i> “
IgG	- imunoglobulin G
IMDM	- z angl. „ <i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i> “
INRGSS	- z angl. „ <i>International Neuroblastoma Risk Group Staging System</i> “
INSS	- z angl. „ <i>International Neuroblastoma Staging System</i> “
K-RAS	- z angl. „ <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> “
MDM2	- z angl. „ <i>Mouse double minute 2 homolog</i> “
MDR	- mnohočetná léková rezistence
MFO	- monooxygenasy se smíšenou funkcí
MIBG	- ¹³¹ I-metaiodobenzylguanidin
MoAb	- monoklonální protilátky
MYCN	- z angl. „ <i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma Derived Homolog</i> “
NB	- neuroblastom
NGF	- nervový růstový faktor (z angl. „ <i>Nerve growth factor</i> “)
NME1	- z angl. „ <i>Nucleoside diphosphate kinase 1</i> “
N-RAS	- z angl. „ <i>Neuroblastoma rat sarcoma</i> “
NT-3	- neurotrofin-3
NTRK	- neurotrofinový tyrosinkinasový receptor
P	- krátké raménko chromozomu
p53	- protein p53 kódovaný genem <i>TP53</i>
PBS	- fosfátový pufr s chloridem sodným (z angl. „ <i>Phosphate Buffered Saline</i> “)
PHOX2B	- z angl. „ <i>Paired-like homeobox 2b</i> “
PPM1D	- z angl. „ <i>Protein-phosphatase 1D magnesium dependent, delta isoform</i> “

pRb	- retinoblastomový protein
Q	- dlouhé raménko chromosomu
RAS	- z angl. „ <i>Rat sarcoma</i> “
RNA	- ribonukleová kyselina
rpm	- počet otáček za minutu (z angl. „ <i>Revolution per minute</i> “)
RT-PCR	- kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase
SDS	- dodecylsulfát sodný
S-fáze	- syntetická fáze buněčného cyklu (z angl. „ <i>Synthesis</i> “)
TBE	- z angl. „ <i>Tris/Borate/EDTA</i> “
TCA	- trikarboxylové kyseliny
TEMED	- N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
TNP-470	- <i>O</i> -(<i>N</i> -chloroacetyl-carbamoyl)-fumagillol
TP53	- transkripční faktor kódující protein p53
Tris	- tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkA	- z angl. „ <i>Tropomyosin receptor kinase A</i> “
TrkB	- z angl. „ <i>Tropomyosin receptor kinase B</i> “
TrkC	- z angl. „ <i>Tropomyosin receptor kinase C</i> “
tRNA	- transferová ribonukleová kyselina
v/v	- objem/objem
w/v	- hmotnost/objem
WB	- Westernový přenos (z angl. „ <i>Western blot</i> “)

1. Úvod

Pojem „rakovina“ neboli nádorové onemocnění označuje řadu patologických změn vyznačujících se deregulací buněčného cyklu a metabolismu vedoucí k nekontrolovatelné proliferaci buněk ¹. Průběh tohoto onemocnění je řízen genetickými a epigenetickými transformacemi ovlivněnými dědičnými faktory a somatickým prostředím ².

Proces kancerogeneze je velmi složitý a víceetapový, přesto je rakovina hlavní příčinou úmrtí v ekonomicky vyspělých zemích a druhou hlavní příčinou úmrtí v rozvojových zemích. To je způsobeno nejen zvyšujícím se průměrným věkem člověka, ale i jeho životním stylem (který zahrnuje nevhodnou stravu, nedostatek pohybu a stres) a znečištěným prostředím ^{3,4}.

Nádorové onemocnění se objevuje u jedinců každého věku, výskyt rakoviny u dětí je však méně častý, představuje jen asi 2 % všech případů rakoviny. Přesto je to po traumatu druhá nejčastější příčina úmrtí dětí starších 1 roku života. Každý rok připadne přibližně 130 nových případů rakoviny na milion dětí mladších patnácti let (přibližně 1 dítě na 7000 dětí) ^{2,5,6}. Pravděpodobnost přežití do dospělosti u dětí léčených na rakovinu se za posledních 30 let zvedla z 30 % na 80 % díky značnému pokroku protinádorové léčby ^{7,8}. Ta se od chirurgické léčby a radioterapie rozšířila o chemoterapii a biomodulační léčbu a díky pokrokům molekulární biologie a genetiky, vedoucím ke stále se rozšiřujícímu poznání mechanismů kancerogeneze, vzniká stále komplexnější cílená terapie nádorových onemocnění ⁹.

1.1. Normální růst buňky a maligní transformace

Během normálního růstu se buňky vyvíjejí tak, aby byly schopny provádět vysoce specializované funkce, které zajistí fyziologické potřeby organismu. Vývoj a růst buněk, stejně tak procesy jako je proliferace, buněčná diferenciaci nebo programovaná buněčná smrt (apoptosa) jsou přísně kontrolovány a regulovány. Osud buněk není řízen pouze jejich genotypem, ale také prostředím, ve kterém se vyskytují, neboť buňky používají složité signální dráhy a vnímají a reagují na signály sousedních buněk a extracelulárního prostředí ².

Proces vzniku a vývoje nádorů, resp. proces přeměny nenádorové buňky v nádorovou se označuje jako kancerogeneze (nebo též karcinogeneze) ¹⁰. Je to vícestupňový proces, na jehož počátku stojí změna na úrovni buněčného jádra, tedy nahromadění genetických změn v DNA, které způsobí nesprávný přepis genu a tím vznik nefunkčního či funkčně

pozměněného proteinu ^{2,11}. Nejzávažnější jsou poruchy genů pro proteiny, které se podílí na přenosu signálů, kontrole exprese genů, kontrole správnosti replikace DNA a chromozomů, regulaci buněčného cyklu, dělení a diferenciaci buněk, mezibuněčné komunikaci a apoptose ¹².

Změna nebo inaktivace některého z regulačních procesů může vést k neregulovanému růstu, který je charakteristickým znakem nádorových buněk. Maligní transformace mohou být dále charakterizovány selháním diferenciací či buněčnou dediferenciací, zvýšením invazivity, vznikem metastáz a sníženou citlivostí na léčiva. Zvýšená proliferace buněk a potlačení apoptosy či senescence mají za následek akumulaci přebytečných buněk. Nádorové buňky také vykazují sníženou schopnost reagovat na regulační signály. Signály generované protoonkogeny zajišťují růst buňky, neboť protoonkogeny mohou kódovat růstové faktory nebo jejich receptory, intracelulární signalizační molekuly nebo transkripční faktory. Právě proto v případě jejich deregulované exprese může docházet k maligní transformaci buněk. Naopak tumorsupresorové geny kontrolují a omezují růst a proliferaci buněk a jejich inaktivace může vést k neregulovanému růstu nádorových buněk. Neméně důležité jsou geny regulující buněčnou smrt, neboť jejich inaktivace vede k odolnosti vůči apoptose a umožňuje hromadění dalších genetických aberací ².

Nádorové buňky nesou DNA, která má bodové mutace; virové inserce; či chromozomové nebo genové amplifikace, delece nebo přestavby. Bodové mutace mohou ukončit translaci proteinu, změnit funkci proteinu nebo změnit regulační cílové sekvence, které řídí expresi genů. Chromozomové změny mohou vytvářet nové genetické souvislosti v genomu a vést k tvorbě nových proteinů či k poruše regulace genů ².

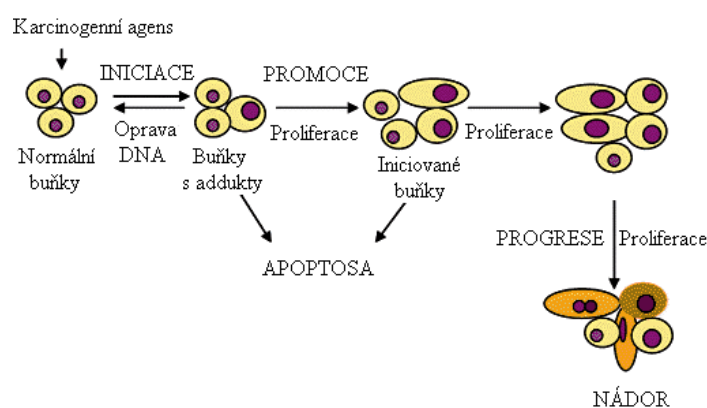
1.1.1. Fáze kancerogeneze

Proces kancerogeneze lze rozdělit do tří fází: iniciační, promoční a progresní (Obr. 1 na straně 13).

V iniciační fázi dochází ke změně genetické informace buňky. To má za následek mutaci DNA, která se může vyskytovat právě v již zmíněných protoonkogenech nebo v tumorsupresorových genech. Takové poškození DNA může být opraveno, jako klíčová se v tomto procesu jeví buněčná proliferace - dojde-li k buněčnému dělení, dříve než reparační systémy stihnou opravit DNA, potom je změna v DNA trvalá a nevratná. Inicie může být spontánní (depurinace DNA, deaminace DNA, chyby v replikaci) či indukovaná. Iniciovaná buňka není nádorová a může zůstat latentní až několik let ¹³.

V promočním stadiu jsou buňky stimulovány k ještě intenzivnější proliferaci. Promoční faktory samy o sobě nejsou schopny vyvolat maligní transformaci, mohou ji jen podpořit - tyto látky zvyšují proliferaci buněk u citlivých tkání, přispívají k upevnění mutace, posilují změny genetické exprese a způsobují změny v kontrole buněčného růstu. Promotory mohou ale také nepřímo poškodit DNA oxidací. Tato fáze trvá několik let až desetiletí ^{14,15}.

Poslední fází kancerogeneze je progrese, která se vyznačuje irreverzibilitou, genetickou nestabilitou, rychlejším růstem, invazivitou, vznikem metastáz a změnami v biochemických, metabolických a morfologických vlastnostech buněk. V této fázi dochází ke změně benigního nádoru v maligní a k nekontrolovatelnému růstu buněk. Důležitou podmínkou pro růst nádoru je jeho zásobení kyslíkem a živinami, toho je dosaženo angiogenezí ^{13,15}.



Obr. 1 – Fáze kancerogeneze (upraveno dle ¹³). V iniciační fázi dochází k mutaci DNA, toto poškození DNA může být ještě opraveno. V promočním stádiu jsou buňky stimulovány k proliferaci, která přispívá k upevnění vzniklých mutací. Progrese je charakteristická nekontrolovatelným růstem buněk, v této fázi se z benigního nádoru stává maligní.

1.1.2. Znaky nádorových buněk

Vznik maligní buňky je výsledkem dlouhého procesu, kdy v buňkách dochází k narušení či pozměnění některých kontrolních mechanismů a tím k nerovnováze způsobující nekontrolovatelné dělení. Ve vznikajících nádorech je běžným jevem genetická nestabilita a heterogenita, dále dochází k selekci buněk, které uniknou kontrolním mechanismům. Nádorové onemocnění je tak příkladem klonální evoluce uvnitř těla organismu ¹⁶.

Maligní buňka se dle Hanahana a Weinberga vyznačuje šesti základními znaky, které byly v roce 2011 rozšířeny o další charakteristické vlastnosti (Obr. 2 na straně 15). Tyto znaky pravděpodobně sdílí všechny lidské nádory ^{17,18}.

Soběstačnost v růstových signálech – Normální buňky vyžadují přítomnost mitogenních růstových faktorů k tomu, aby mohly přejít z klidového stavu do proliferačního, nádorové buňky vytvářejí vlastní růstové signály a tím snižují svou závislost na stimulaci z okolí. Nezávislost maligních buněk na exogenních signálech narušuje homeostatické mechanismy zajišťující správné chování různých typů buněk v tkáni. Dalším cílem deregulace při patogenezi nádoru jsou povrchové receptory přenášející signály do buňky. Zvýšená exprese receptorů, zvýšená citlivost na dané signály, nebo chybějící extracelulární část receptoru může umožnit rakovinné buňce, aby se stala mnohem citlivější na okolní růstové signály^{17,19}.

Necitlivost k signálům potlačujícím růst – Tyto signály blokují buněčnou proliferaci dvěma mechanismy. Buď jsou buňky vytlačeny do klidové fáze (G_0), nebo permanentně opustí proliferační potenciál vstupem do postmitotické fáze (G_1) spojené se získáním znaků diferenciace¹⁷.

Vyhýbání se apoptose – Apoptosa je založená na dvou hlavních komponentách, a to senzorech a efektorech. Senzory kontrolují extracelulární a intracelulární prostředí a zjišťují případné abnormality ovlivňující to, zda buňka bude žít dál nebo zemře. Právě tyto signály regulují efekty apoptotické smrti¹⁷. Nejčastěji se buňky vyhýbají apoptose mutací tumorsupresorového genu p53, mezi hlavní regulátory apoptosy patří proteiny rodiny Bcl-2^{9,17}.

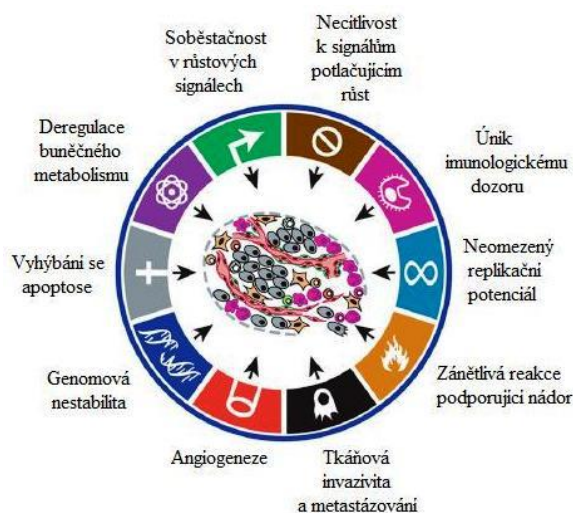
Neomezený replikační potenciál – Zdravé buňky jsou schopny dělit se asi 60 – 70x, neboť při každé replikaci DNA dochází ke zkrácení telomer (ochranných sekvencí) o 50 – 100 párů bazí. Nádorové buňky si udržují délku svých telomer díky aktivnímu enzymu telomerase, což vede k neomezenému počtu dělení (imortilizaci)^{17,20,21}.

Angiogeneze (tvorba nových cév) – Krevní řečiště zdravého dospělého člověka je víceméně konstantní. Rostoucí nádorové ložisko může bez cévního zásobení dosáhnout velikosti pouze asi 1 – 2 mm³, kdy přísun kyslíku a živin je možný difúzí z okolní tkáně, proto je pro nádor indukce tvorby nových cév limitující. Popudem pro angiogenezi je hypoxie, která navodí genetickou nestálost a vznik mutací zodpovědných za nerovnováhu mezi antiangiogenními a proangiogenními faktory^{15,17,18}.

Posledním z šesti základních znaků nádorového onemocnění je tkáňová invazivita a vznik metastáz. Maligně transformované buňky ztrácí závislost adherovat k podkladu, vyznačují se zvýšenou motilitou a schopností pronikat do okolí. Po průniku z krevní cirkulace nebo lymfatického systému jsou schopné se usadit v oblastech vzdálených od primárního nádoru. Dále jsou tyto buňky vybaveny schopností produkovat receptory

k zachycení se na proteinech bazální membrány, také tvoří hydrolytické enzymy, které pomohou rozrušit kolageny, proteoglykany a glykosaminoglykany bazální laminy a umožní tak pronikání do okolí a založení metastázy, proliferování. To je tzv. metastázový fenotyp^{15,17}. Právě metastázy jsou z 90 % zodpovědné za úmrtí onkologických pacientů²².

Těchto šest znaků nádorových buněk bylo později doplněno ještě o genomovou nestabilitu, zánětlivou reakci podporující nádor, únik imunologickému dozoru a deregulaci buněčného metabolismu¹⁸. Poslední bod se týká tzv. Warburgova efektu, který je typický pro nádorové buňky. V nádorových buňkách probíhá glykolýza mnohem intenzivněji, avšak je odpojena od mitochondriálního cyklu trikarboxylových kyselin (TCA) a oxidativní fosforylace, takže konečným produktem je laktát, který snižuje pH nádoru. Touto glykolýzou buňka sice získá méně energie ve formě ATP, ale za to mnohem rychleji²³.



Obr. 2 – Znaky nádorových buněk dle Hanahana a Weinberga (upraveno dle¹⁸).

1.2. Neuroblastom

Neuroblastom (NB) je embryonální nádor nervového systému. Vzniká během fetálního vývoje nebo časně postnatálního života ze sympatických buněk neurální lišty. Je to nejčastější solidní extrakraniální maligní onemocnění vyskytující se u dětí do jednoho roku života²⁴. Neuroblastom je velmi heterogenní onemocnění, které zahrnuje i vzácné familiární (< 2 %) a sporadické formy²⁵.

U dětí do 15 let věku představuje neuroblastom přibližně 7 % ze všech nádorových onemocnění, z 15 % se podílí na úmrtí na nádorové onemocnění v dětském věku. V České republice je ročně diagnostikováno 25–30 dětí s neuroblastomem. 50 % případů se vyskytuje u dětí do 2 let věku, 75 % do 4 let věku a 90 % do 10 let věku. U adolescentů a mladých

dospělých je NB poměrně vzácný, v dospělém věku spíše raritní záležitostí. Ve věkové skupině do 1 roku věku je NB nejčastější malignitou vůbec. Při studiu nekroptického materiálu u dětí do 3 měsíců věku byla incidence neuroblastomových struktur 1:259, což je asi 400x více, než je popisovaná klinická incidence. To svědčí o spontánní involuci či maturaci u naprosté většiny dětí. NB má ze všech nádorů nejvyšší míru spontánní regrese^{26–28}. Klinické projevy neuroblastomu lze rozdělit do tří odlišných vzorců: život ohrožující progres, zrání na ganglioneuroblastom nebo ganglioneurom a spontánní regrese²⁹.

Etiologie neuroblastomu není známa. NB je onemocnění buněk sympatoadrenálního systému, proto se nádor může vyvinout kdekoli v sympatickém nervovém systému. Většina primárních nádorů (65 %) se vyskytuje v oblasti břicha a alespoň polovina z nich vzniká v dřeni nadledvin. Mezi další obvyklá místa výskytu neuroblastomu se řadí krk, hrudník a pánev^{28,30}.

Symptomatologie je velmi variabilní a závisí na lokalizaci primárního nádoru, na rozsahu onemocnění, stejně jako na přítomnosti metastáz. Neuroblastom je charakteristický velmi širokým spektrem klinických projevů, schopností časné generalizovat a značně rozdílnou prognózou u lokalizovaných a generalizovaných forem u kojenců a dětí starších jednoho roku^{28,30}.

1.2.1. Genetické změny u neuroblastomu

Predispozice k onemocnění neuroblastomem byly nalezeny jen ve velmi malém procentu případů (asi 1 - 2 %) zejména kvůli častým spontánním remisím a inkompletní penetraci neuroblastomu. Dědičnost predispozice se jeví jako autozomálně dominantní v souladu s Knudsonovou hypotézou o dvou nezávislých mutacích alely genu zodpovědného za dané nádorové onemocnění. Všechny geny pro predispozici nejsou doposud přesně známy, ve většině případů je ale diagnostikována mutace tyrosinkinasové domény ALK („*ana-plastic lymphoma kinase*“) onkogenu a mutace genu PHOX2B, také se předpokládá lokalizace dalších genů zodpovědných za většinu familiárních případů neuroblastomu na krátkém raménku chromozomu 16 (16p12-13)^{30–33}.

V naprosté většině případů se NB objevuje sporadicky. Ve vývoji sporadického neuroblastomu hraje důležitou roli řada genetických změn, které zahrnují aktivaci onkogenů, přebytek či ztrátu řady alel, změny v ploidii nádorových buněk a další.

Protein MYCN je členem rodiny proto-onkogenů MYC. MYCN je transkripční faktor řídící expresi mnoha cílových genů, které následně regulují základní buněčné procesy,

včetně proliferace, růstu buněk, syntézy bílkovin, metabolismu, apoptosy a diferenciace. Funkce tohoto proteinu je omezena na vyvíjející se neuroektoderm pouze po dobu embryonálního a fetálního vývoje. Gen pro MYCN je lokalizován na chromosomu 2 (2p24). Amplifikace MYCN (> 10 kopií na buňku) je jednou z nejčastějších genetických mutací vyskytující se nejen u neuroblastomu, ale i u dalších nádorových onemocnění^{34–36}. Má za následek zvýšený buněčný růst a zároveň snížení apoptosy, což vede k rychlé progresi nádoru. Projevem výrazné amplifikace tohoto onkogenu jsou v buňkách tzv. DM tělíska („*double minutes chromatin bodies*“) nebo HSR úseky („*homogenously staining regions*“). Amplifikace MYCN onkogenu je spojena především s pokročilými stádii onemocnění, ale i u dětí s nižšími stádii je nález jeho amplifikace spojen s rychlou progresí onemocnění, špatnou odpovědí na léčbu a celkově velmi špatnou prognózou^{26,36–38}.

Významnou změnou v genomu buněk neuroblastomu je delecí krátkého raménka chromozomu 1 (kritická oblast 1p36), která se vyskytuje ve 25 – 35 % případů, zejména tedy u pacientů s pokročilým stádiem onemocnění, kde zpravidla koreluje s amplifikací MYCN^{30,39}. Ke ztrátě genetického materiálu dochází také při delecí 11q. Tento nepříznivý prognostický faktor se vyskytuje téměř u 43 % pacientů a je v inverzní korelaci s amplifikací MYCN a delecí 1p⁴⁰.

Charakteristickou změnou neuroblastomových buněk je také zmnožení genetického materiálu (trisomie) na dlouhém raménku chromozomu 17. To může způsobit zvýšenou expresi jednoho nebo více genů, kterými jsou BIRC5 (survivin), NME1 či PPM1D³⁰.

Neurotrofinové receptory (tyrosinkinasy NTRK1, NTRK2 a NTRK3 kódující TrkA, TrkB a TrkC) a jejich ligandy (NGF, BDNF respektive NT-3) jsou důležitými regulátory růstu, přežití a diferenciace nervových buněk, mají významnou roli při maligní transformaci. Zatímco vysoká exprese TrkA receptoru je charakteristická především pro prognosticky příznivá onemocnění mladších dětí a kojenců a nízká klinická stadia onemocnění s absencí MYCN amplifikace, vysoká exprese receptorů TrkB je prognosticky nepříznivým faktorem. TrkB/BDNF autokrinní stimulace podporuje navíc aktivně angiogenezi a je zodpovědná i za lékovou rezistenci neuroblastomu. TrkC je specifický pro prognosticky příznivá onemocnění^{30,41,42}.

Geny, které bývají nejčastěji pozměněny v případě nádorových onemocnění dospělých (např. p53, CDKN2A, RAS), jsou jen zřídka u neuroblastomu. Tumor-supresorový gen p53 má ve zdravých buňkách významnou roli při jejich ochraně před nestabilitami genomu a vznikem nádoru díky schopnosti indukce apoptosy a zastavení buněčného cyklu v závislosti na zátěži buněk a poškození DNA. V neuroblastomu jsou

mutace p53 velmi vzácné (< 2 %; při relapsu asi 15 %), avšak je možná jeho inaktivace v důsledku jiného genetického poškození jako například při amplifikaci MDM2 (negativní regulátor p53)⁴³.

1.2.2. Klinická stádia neuroblastomu

V roce 1986 byl navržen systém klasifikace pacientů s neuroblastomem INSS („*International Neuroblastoma Staging System*“). Tento systém byl navržen na základě klinického, radiografického a chirurgického hodnocení neuroblastomu a rozděluje pacienty dle prognózy do čtyř skupin (stádií) uvedených níže. Jelikož byla tato klasifikace založena výhradně na určení rozsahu nádoru, byla později doplněna. Systém INRGSS („*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*“) je založený na klinických, histologických a biologických faktorech^{44,45}.

Stádium 1 – lokalizovaný nádor v místě svého původu, kompletně makroskopicky odstraněn s nebo bez mikroskopických residuí. Ipsilaterální a kontralaterální lymfatické uzliny jsou histologicky negativní^{45–47}.

Stádium 2A – unilaterální nádor nekompletně makroskopicky odstraněn, ipsilaterální a kontralaterální lymfatické uzliny jsou histologicky negativní. Stádium 2B - unilaterální nádor kompletně či nekompletně makroskopicky odstraněn, ipsilaterální lymfatické uzliny jsou histologicky pozitivní, kontralaterální negativní^{45–47}.

Stádium 3 – nádor infiltrující přes střední čáru s nebo bez zasažení lymfatických uzlin; nebo lokalizovaný unilaterální nádor se zasažením kontralaterálních uzlin; nebo středočárový nádor se zasaženými bilaterálními uzlinami^{45–47}.

Stádium 4 – nádor diseminovaný do vzdálených lymfatických uzlin, kostí, kostní dřeně, jater a dalších orgánů (s výjimkou definovanou stádiem 4S). Stádium 4S – lokalizovaný nádor definovaný stádií 1 a 2 s diseminací omezenou na játra, kůži a kostní dřeň u dětí do 1 roku^{45–47}.

INRGSS definuje neuroblastom stádií L1, L2, M a MS, nicméně jsou velmi podobná stádiím definovaným INSS (INSS stádium 1 → INRGSS stádium L1, INSS stádia 2 a 3 → INRGSS stádium L2, INSS stádium 4 → INRGSS stádium M a INSS stádium 4S → INRGSS stádium MS)⁴⁴.

1.2.3. Léčba neuroblastomu

NB je velmi variabilní onemocnění, a proto jeho léčba vyžaduje široké spektrum metod, které standardně zahrnují chirurgii, chemoterapii, radioterapii a bioterapii. Samotná léčba je

také odrazem individuálně stanoveného stupně rizika nepříznivého průběhu onemocnění. Na základě klinických (klinické stádium, věk pacienta), biologických (histologie, ploidie tumoru) a genetických (amplifikace MYCN, delece 1p a 11q) prognostických faktorů jsou pacienti rozděleni do skupiny neuroblastomu nízkého, středního a vysokého rizika, nicméně u některých novorozenců a kojenců do 3 měsíců věku je možné vyčkat spontánní regrese neuroblastomu ^{30,48}.

Nádory u pacientů nízkého rizika (přežití bez známek choroby 3 roky od stanovení diagnózy 95 – 100 %) s lokalizovanými formami neuroblastomu jsou řešitelné prostou chirurgickou excizí, dále pak pozorováním, případně šetrnou chemoterapií. Pacienti středního rizika (přežití bez známek choroby 3 roky od stanovení diagnózy 85 – 90 %) jsou potencionálně dobře léčitelní konvenční chemoterapií. Naproti tomu u dětí s onemocněním vysokého rizika (přežití bez známek choroby 3 roky od stanovení diagnózy 30 – 35 %) často selhává i kombinovaná léčba stávající z indukčního režimu, proto je veškerá snaha upírána na možnost zlepšení léčebných výsledků u pacientů s neuroblastomem středního a vysokého rizika ⁴⁸.

Novým směrem v léčbě neuroblastomu by mohly být inhibitory angiogeneze (TNP-470, COX-2, fenretinid) ^{48–50}. Do popředí se také dostávají inhibitory topoisomerasy I (topotecan, irinotecan). NB je radiosenzitivní onemocnění a externí radioterapie je nedílnou součástí léčby u velké části pacientů, zároveň jsou ale známy a rozvíjeny i postupy o cílenou dávku ionizujícího záření do tkáně tumoru pomocí nosičů – MIBG, analogů somatostatinu či anti-GD2 protilátek ^{48,51}. Význam v léčbě rizikových pacientů má také 13-cis-retinová kyselina. Retinoidy mohou nejen inhibovat buněčný růst, indukovat diferenciaci, ale jsou schopné i indukovat apoptosu nádorových buněk. V preklinických studiích se velmi nadějně jeví i terapie zaměřené na ALK ^{30,33,48–51}.

1.3. Protinádorová chemoterapie

Cytostatika neboli protinádorová léčiva jsou látky, které se spolu s dalšími terapeutickými postupy používají k léčbě nádorových onemocnění. Cílem cytostatické léčby je zajistit optimální farmakoterapeutický účinek při minimální toxicitě vůči zdravé tkáni vedoucí ke zpomalení nebo zastavení růstu nádorových buněk. Jedná se o systémovou léčbu, kdy cytostatika omezují dělení buněk a zasahují do jejich metabolických procesů. Zvláště účinně postihují buňky připravující se na buněčné dělení, proto přednostně poškozují rychle se dělící maligní buňky. Nevýhodou této léčebné metody je, že není schopna selektivně ničit

pouze nádorové buňky, ale působí i na zdravé tkáně, které se fyziologicky vyznačují rychlým dělením a vysokou incidencí mitóz (např. kostní dřeň, vlasové folikuly, střevní epitel) ^{52–54}.

1.3.1. Mechanismus účinku cytostatik

Protinádorová léčiva lze rozdělit dle mechanismu účinků do několika základních skupin:

Antimetabolity – Jako antimetabolity se označují látky, které jsou strukturálně podobné přirozeným substrátům pro tvorbu nukleosidů a nukleotidů, mají tedy přímý inhibiční účinek na biosyntézu nukleových kyselin. Do této skupiny se řadí analoga kyseliny listové (metotrexát – blokuje enzym hydrofolátreduktasu, čímž znemožňuje redukci kyseliny listové a tím i syntézu DNA a RNA), analoga purinů (merkaptopurin – blokuje biosyntézu purinů, čímž se naruší syntéza nukleových kyselin) a analoga pyrimidinů (fluorouracyl – blokuje syntézu kyseliny thymidylové a tím i syntézu DNA). Inhibitory ribonukleotidreduktasy sice nepatří mezi antimetabolity, ale důsledky jejich působení jsou stejné. Hlavním představitelem je hydroxyurea ^{9,55}.

Alkylační látky – Jsou to látky s odlišnou strukturou, avšak mají shodné účinky. Tyto sloučeniny jsou chemicky labilní a přenášejí alkylové radikály na struktury tělu vlastní. Jejich kovalentní vazba na DNA má pro buněčný metabolismus vážné důsledky a dochází k inhibici buněčného dělení. Příkladem alkylačních činidel je např. karmustin, cisplatina nebo cyklofosamid ^{55,56}.

Interkalační látky – Interkalace je nekovalentní vazba cytostatika na DNA. Molekula cytostatika se zasune mezi dvoušroubovici DNA, kde se váže vodíkovými můstky. Výsledkem je inhibice replikace i transkripce vyvolaná zlomy DNA. Většina interkalačních látek též inhibuje topoisomerasu II. Četné z těchto látek jsou produkty streptomycet nebo aktinomycet. Příkladem jsou aktinomyciny či antracyklinová antibiotika (epirubicin, doxorubicin, amrubicin) ^{9,55,56}.

Inhibitory topoisomeras – DNA topoisomerasy jsou nukleární enzymy, které mají zásadní význam pro průběh replikace. Dvoušroubovice DNA prodělává torzi kolem vlastní osy, což může vést k překroucení dvoušroubovice a k indukci zlomu v jednom či obou řetězcích (kritické zejm. v S-fázi buněčného cyklu při vzniku tzv. replikační vidlice). Topoisomerasa I se váže na jeden řetězec dvoušroubovice, který rozpojí, uvolní nadměrnou torzi a přerušovaný řetězec opět spojí. Topoisomerasa II se váže na oba řetězce, působí jejich přerušování a opětovné spojení. Při porušení funkce topoisomeras nedojde k opětovnému spojení řetězců a vzniklé zlomy v DNA mají pro buňku lethální důsledky ⁵⁶.

Radiomimetika – Tímto názvem se označují antibiotika polypeptidové povahy (neomycin, peplomycin), která podobně jako ionizující záření štěpí DNA ⁵⁵.

Inhibitory mitosy – „Mitotické jedy“ svou vazbou na tubulin ruší funkci dělicího vřeténka. Do této skupiny patří především látky rostlinného původu jako vinkaalkaloidy (vinkristin) nebo taxany ⁵⁵.

Inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDKi) – Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou spolu s cykliny hlavními pozitivními regulátory buněčného cyklu a RNA transkripce. Maligní buňky se vyznačují jak alterací pozitivních regulátorů buněčného cyklu, tak mutací či epigenetickým umlčením exprese přirozených CDKi. Tyto genetické či epigenetické alterace vyústí v aberantní aktivaci signální dráhy pro retinoblastomový protein, která je hlavním spouštěčem přechodu buňky z G₁-fáze do S-fáze. CDKi představují relativně novou skupinu protinádorových látek. Mezi zástupce patří např. flavopiridol nebo purinová analoga bohemin a olomoucín ⁹.

Monoklonální protilátky – Monoklonální protilátky (MoAb) byly po dlouhou dobu používány pouze k diagnostickým účelům. MoAb používané v protinádorové terapii patří většinou do třídy IgG a jsou zpravidla monospecifické ⁹.

Hormonální léčiva – Tato léčiva se používají u hormonálně dependentních nádorů, kdy lze podáním antagonistů utlumit růst nádorů podmíněných nadbytkem jiných hormonů nebo podáním antagonistů hormonů se blokuje účinek toho hormonu, který je zodpovědný za růst nádoru ⁵⁵.

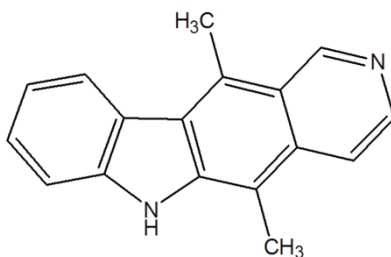
Cytostatika s dalšími mechanismy účinku – Do této skupiny jsou zařazeny látky, jejichž mechanismus nezapadá výhradně do některé z výše uvedených skupin cytostatik, jako například inhibitory proteosyntézy (L-asparaginasa), inhibitory degradace proteinů zajišťující blokaci ubikvitin proteasového systému, inhibitory tyrosinkinas (imatinib), látky poškozující buněčné membrány (eldefosin) a další ^{9,55}.

Léčiva standardně používaná při léčbě neuroblastomu zahrnují sloučeniny platiny, alkylační činidla, inhibitory topoisomerasy II, antracykliny a vinkristin ^{33,57}.

1.3.2. Ellipticin

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol, Obr. 3 na straně 22) je jedním z přirozeně se vyskytujících alkaloidů, které jsou izolovány z listů jehličnatého stromu *Ochrosia elliptica* Labill (*Apocynaceae*) rostoucího v Oceánii ⁵⁸. Význam tohoto alkaloidu a některých jeho polárnějších derivátů spočívá v jejich protinádorové a anti-HIV aktivitě. O jeho klinické využití je zájem nejen pro jeho účinky na nádorová onemocnění, ale také

z důvodu jeho relativně nízkých vedlejších účinků a prakticky nulové hematotoxicity a hepatotoxicity. Ellipticin a jeho deriváty jsou silnými mutageny a jsou také nefrotoxické^{59–61}.



Obr. 3 – Struktura ellipticinu⁵⁸.

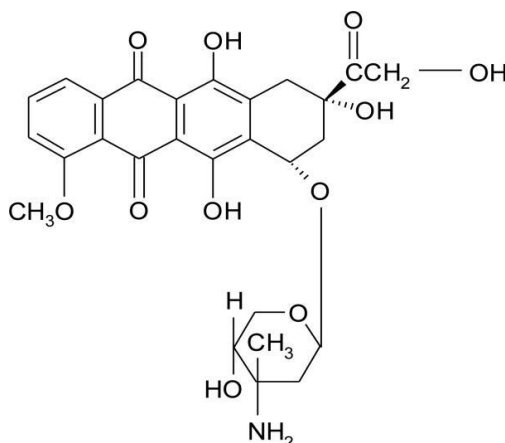
Ellipticin a jeho deriváty navozují apoptosu buňky prostřednictvím kombinovaného mechanismu zástavy buněčného cyklu; přesný mechanismus účinku ellipticinu není znám, předpokládá se však, že je založen na interkalaci ellipticinu do dvoušroubovice DNA, inhibici topoisomerasy II, selektivní inhibici fosforylace proteinu p53, inhibici oxidační fosforylace, inhibici telomeras a kovalentní modifikaci DNA^{61–64}.

Interkalace ellipticinu do dvoušroubovice DNA je možná díky velikosti a planárnímu tvaru molekuly, je způsobena slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi mezi bázemi DNA – k interakci dochází mezi methylenovými skupinami ellipticinu a thyminu^{59,62}. Ellipticin také může reagovat s topoisomerasou II nebo s DNA za vzniku katalyticky inaktivního ternárního komplexu, který je zodpovědný za tvorbu zlomů DNA vedoucích k buněčné smrti^{62,65,66}. Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53 je pravděpodobně způsobena tím, že ellipticin a 9-hydroxyellipticin inhibují specifickou cyklin-dependentní kinasu. Nahromadění defosforylovaného proteinu p53 může indukovat apoptosu⁶⁷. Inhibice oxidační fosforylace způsobuje velké snížení obsahu ATP v buňkách, což vede k jejich zániku⁶⁸.

Výše uvedené mechanismy účinku ellipticinu jsou založeny na nespecifickém transportu molekuly léčiva přes buněčnou membránu do buněk zdravých i nádorových, avšak ellipticin vykazuje i specifické působení na buňky. Tím je kovalentní vazba léčiva na DNA po jeho enzymové aktivaci cytochromy P450 a peroxidasami^{61,69}, což bude rozvedeno v kap. 1.4.1. na straně 24.

1.3.3. Doxorubicin

Doxorubicin (14-hydroxyldaunorubicin, Obr. 4) byl poprvé izolován z hub *Streptomyces peuceticus* var. *Caesius*. Je to antracyklinové antibiotikum potenciující účinek radiační terapie. Na léčbu doxorubicinem reaguje široké spektrum solidních nádorů a hematologických malignit, nicméně jeho užití je limitováno kardiotoxicitou ústící až v srdeční selhání a možností vzniku sekundární rezistence^{70,71}.



Obr. 4 – Struktura doxorubicinu¹⁰³.

Doxorubicin se řadí mezi interkalační cytostatika mající inhibiční účinek na topoisomerasu II, avšak přesné mechanismy účinku nejsou plně známy. Doxorubicin se díky planární struktuře může zasunout mezi páry guaninu a cytosinu v molekule DNA a inhibovat jak replikaci, tak transkripci DNA. Hlavním mechanismem účinku je však interakce doxorubicinu s topoisomerasou II a následná tvorba zlomů v DNA, která je pro buňku lethální^{72–75}.

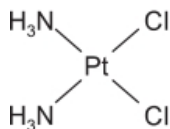
Kromě výše zmíněných mechanismů se dále uvádí vliv doxorubicinu na další enzymy modifikující DNA, na přímou aktivaci apoptotických molekul regulujících buněčný cyklus a na tvorbu DNA aduktů. Doxorubicin interaguje také s tRNA a spekuluje se nad jeho protinádorovou aktivitou způsobenou tvorbou volných radikálů a reaktivních forem kyslíku. Toto tvrzení je často zpochybňováno a soudí se, že tvorba reaktivních forem kyslíku je zodpovědná zejména za kardiotoxicitu doxorubicinu^{73,75–77}.

1.3.4. Cisplatina

Cisplatina (cis-diammindichloroplatnatý komplex, Obr. 5 na straně 24) patří mezi nejstarší, nejúčinnější a nejběžněji používaná chemoterapeutika účinkující na širokou

škálu lidských malignit. I přes veškeré nežádoucí účinky, zahrnující zejména nefrotoxicitu, neurotoxicitu a ototoxocitu, bývá cisplatina cytostatikem první volby^{78,79}.

Základním mechanismem účinku cisplatiny je alkylace (preferovány jsou báze guaninu). Dále vyvolává aktivaci stresových kinas, což má za následek zvýšenou expresi „death“ receptorů na buněčném povrchu a zároveň zvýšenou transkripci a translokaci solubilních „death“ ligandů, a tedy aktivaci zevní apoptotické dráhy. Předpokládá se, že také inhibuje telomery⁹.



Obr. 5 – Struktura cisplatiny¹⁰⁴.

1.4. Nádorová rezistence

Jedním z hlavních důvodů selhání chemoterapie a nejzávažnější komplikací bývá rozvoj lékové rezistence. Může se jednat o primární necitlivost nádorových buněk k léčbě cytostatiky, častější však bývá rezistence získaná až v průběhu cytostatické léčby zejména kvůli podávání sub-terapeutických dávek cytostatika ve snaze co nejméně zatížit organismus pacienta. O zkřížené rezistenci mluvíme v případě ztráty citlivosti k určitému cytostatiku a zároveň vzniku rezistence k cytostatiku strukturně příbuznému. Vyskytují se ale i případy mnohočetné lékové rezistence (MDR), a to u výskytu zkřížené rezistence u chemoterapeutik odlišných strukturně i mechanismem účinku⁹.

Mechanismy vzniku chemorezistence jsou komplexní povahy. Nejčastěji jsou vázány na změnu farmakokinetiky zahrnující například snížení resorpce, zvýšení vylučování léčiva nebo změnu katabolismu, změnu cytokinetiky při nárůstu populací nádoru, kdy dochází k větší heterogenitě a zároveň většina buněk přechází do G₀-fáze a jejich citlivost k léčivu je omezená. Za rezistenci může být zodpovědná i porucha mechanismů apoptosy způsobená zvýšenou expresí antiapoptotických molekul či inaktivací proapoptotických efektorů, zvýšená rychlost opravy DNA, změna koncentrace nebo aktivity enzymů zodpovědných za biodegradaci cytostatika nebo omezený průchod cytostatika buněčnou membránou^{9,15,80}.

1.4.1. Cytochromy P450

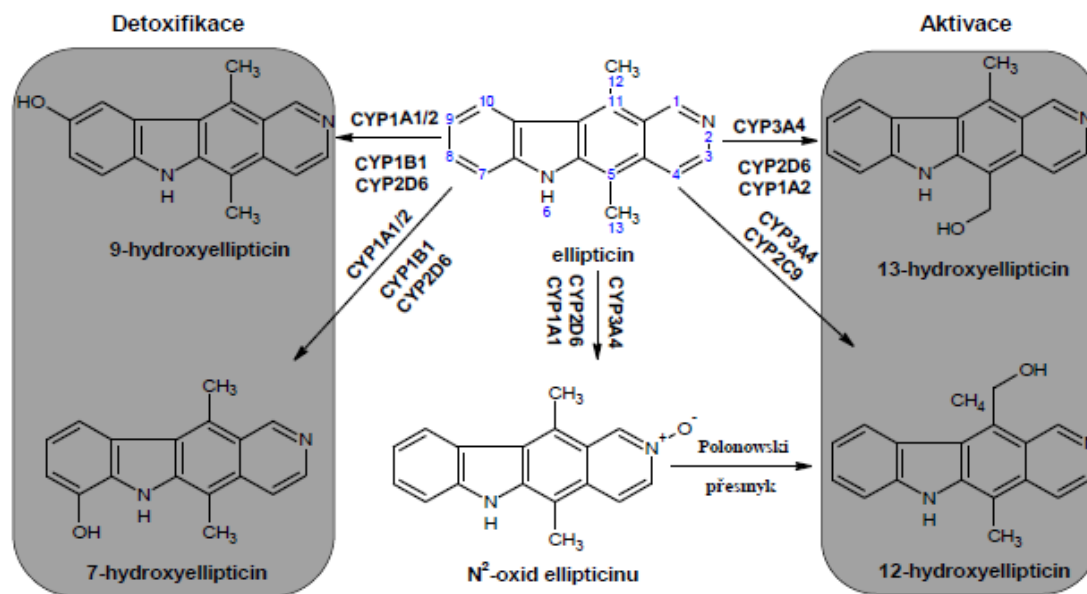
Jedny z nejdůležitějších enzymů metabolizujících xenobiotika jsou mikrosomální monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO), v nichž jako terminální oxidasa

funguje hemový enzym cytochrom P450 (CYP). Cytochromy P450 tvoří superrodinu hemthiolátových enzymů, které katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce začleněné do metabolické transformace léčiv. Tyto enzymy mají ve své molekule nekovalentně vázán protoporfyrin IX, pátým ligandem železa je thiolátová síra sulfhydrylové skupiny cysteinu, který je součástí molekuly enzymu. V klidovém stavu může být šestým ligandem cytochromu P450 také kyslík molekuly vody. Díky tomuto uspořádání získává CYP výjimečné vlastnosti, a tím se odlišuje od klasických cytochromů ⁸¹.

Lidské cytochromy P450 jsou klasifikovány do 17 rodin, ze kterých jsou především tři zapojeny do metabolismu xenobiotik: CYP 1, CYP 2 a CYP 3 (v menší míře také rodina CYP 4) ⁸¹.

Právě cytochromy P450 jsou zapojeny do biotransformace cytostatika elliptycinu, který je jaterními mikrosomy přeměňován na metabolity (Obr. 6 na straně 26). Expres enzymů participujících na tomto procesu tvorby kovalentních aduktů elliptycinu s DNA je klíčová pro protinádorový účinek elliptycinu. Ellipticin může tímto způsobem do určité míry modulovat farmakologický a/nebo genotoxický potenciál ^{61,82}.

CYP 1A1, 1A2 a 1B1 oxidují ellipticin převážně na 7- a 9-hydroxyellipticin, které byly identifikovány jako detoxifikační produkty. Cytotoxické produkty 12-, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid elliptycinu vznikají při metabolické aktivaci elliptycinu CYP 3A4, 1A2, 2D6 a 2C9. N²-oxid elliptycinu je Polonowského přesmykem přeměňován na 13-hydroxyellipticin. 12- a 13-hydroxyellipticin jsou dále spontánně štěpeny na karbeniové ionty ellipticin-12-ylum a ellipticin-13-ylum, které se kovalentně váží na aminoskupinu deoxyguanosinu DNA a tvoří majoritní adukty 2, respektive 1. Ellipticin je také velmi efektivně oxidován peroxidasami, které ho aktivují za tvorby aduktů s DNA totožnými s adukty nalezenými při oxidaci elliptycinu cytochromy P450 ^{59,61,83,84}.



Obr. 6 - Biotransformace ellipticinu katalyzovaná cytochromy P450 (upraveno dle ¹⁰⁵). CYP 1A1, 1A2 a 1B1 oxidují ellipticin převážně na detoxifikační produkty (7- a 9-hydroxyellipticin), CYP 3A4, 1A2, 2D6 a 2C9 přeměňují ellipticin na cytotoxické produkty (12-, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu). N²-oxid ellipticinu je Polonowského přesmykem přeměňován na 13-hydroxyellipticin.

1.4.2. Cytochrom b₅

Cytochrom b₅ je relativně malý, cylindrický, kyselý hemoprotein, jehož součástí je nekovalentně vázaná jedna či dvě molekuly hemu b. Jeho struktura je tvořena šesti α -helixy a pěti β -skládanými listy. Cytochrom b₅ je membránový protein nacházející se na vnější straně endoplasmatického retikula nebo v mitochondriích, volně rozpustná forma se nalézá v cytoplasmě erytrocytů ^{85,86}.

Cytochrom b₅ se zapojuje jako přenašeč elektronů v řadě oxidačních reakcí. Účastní se desaturace mastných kyselin, biosyntézy cholesterolu a řady dalších hydroxylačních reakcí katalyzovaných MFO systémem. Cytochrom b₅ může přijímat elektron z NADH:cytochrom b₅ reduktasy nebo z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, který dále přenáší k dalším enzymům ^{87,88}.

Cytochrom b₅ se fakultativně vyskytuje v systému MFO. Mechanismus jeho účinku není přesně znám, ale existuje několik hypotéz, které se jej snaží objasnit. Jedna z hypotéz předpokládá, že cytochrom b₅ je donorem elektronu pro CYP, který je potřebný pro druhou redukci v monooxygenasovém katalytickém cyklu a pro tvorbu aktivovaného molekulárního kyslíku. Právě tento krok limituje rychlost reakce. Další teorie je založena na efektorovém allosterním působení cytochromu b₅. Jiný předpokládaný mechanismus popisuje tvorbu

dvou-hemoproteinového komplexu cytochromu b₅ s CYP, což by mělo zvyšovat rychlost tvorby aktivního kyslíku. Posledním předpokládaným mechanismem je funkce efektoru cytochromu b₅ v MFO bez oxidačně-redukční funkce^{85,87,89,90}.

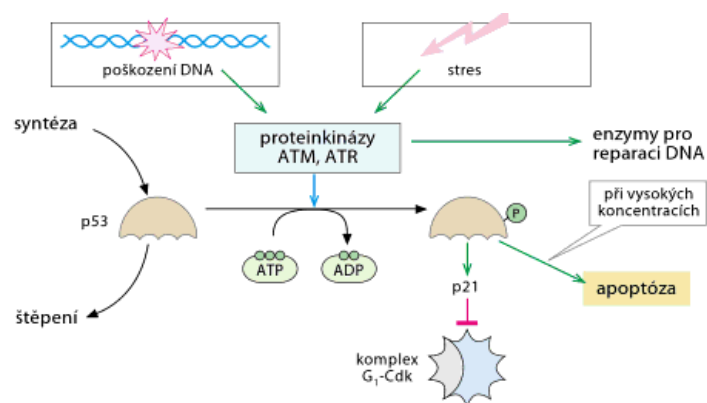
Bylo dokázáno, že cytochrom b₅ může stimulovat, inhibovat nebo nijak neovlivňovat katalytické účinky CYP. Cytochrom b₅ ovlivňuje oxidaci ellipticinu CYP 1A1 a 1A2 ve prospěch aktivačních metabolitů, v případě CYP 3A4 je stimulována tvorba 9-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu (aktivační metabolit)^{83,91,92}.

1.4.3. Protein p53

Jaderný fosfoprotein p53, který je označován za „strážce genomu“, reguluje více než 100 různých genů a podílí se na mnoha buněčných funkcích. Tento DNA vazebný transkripční faktor je kódován genem *TP53*, který je exprimován ve všech buňkách; právě k jeho mutaci dochází u více než 60 % maligních onemocnění^{93,94}.

Protein p53 hraje klíčovou roli při buněčné obraně proti maligní transformaci a progresi díky schopnosti zastavit buněčný cyklus, zprostředkovat apoptosu, opravit DNA a také díky schopnosti senescence po buněčném stresu (Obr. 7 na straně 28). Mechanismus účinku je založen na tom, že výskyt poškozené DNA má za následek transkripci proteinu p21 a dále inhibici cyklin-dependentních kinas (CDK4 a CDK2). To vede k hypofosforylaci retinoblastomového proteinu a k zablokování jeho uvolnění z komplexu s faktorem E2F, důsledkem je nemožnost přechodu z G₁- do S-fáze buněčného cyklu^{15,95}.

Jedním z hlavních regulátorů proteinu p53 je protein MDM2 a také různé formy buněčného stresu (které aktivují p53 tím, že inhibují degradaci p53 zprostředkovanou MDM2). Obecným rysem zhoubných nádorů je mutace *TP53* (typické jsou bodové mutace) nebo narušení cest umožňujících aktivaci p53, díky kterým se buňka může vyhnout jeho cytostatickým a pro-apoptotickým účinkům a také se snáze přizpůsobí případné hypoxii. Mutace p53 může též souviset s mnohočetnou lékovou rezistencí při léčbě neuroblastomu^{95–97}.

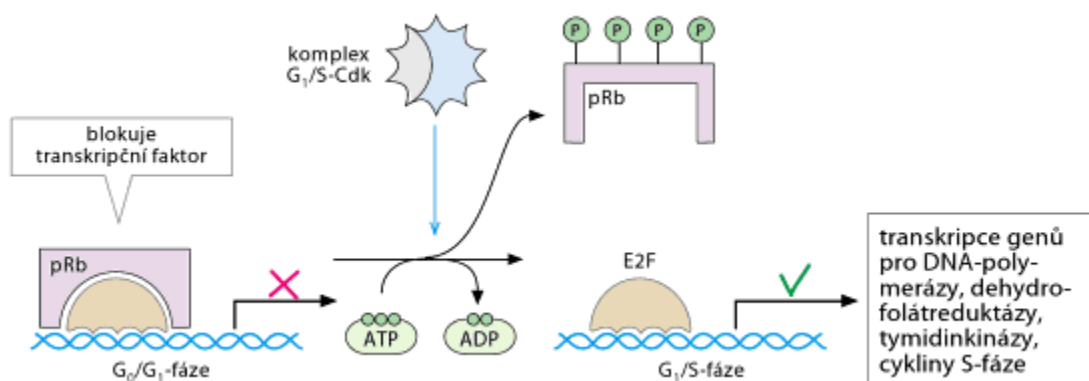


Obr. 7 – Funkce proteinu p53 ¹⁰⁶. Ve zdravých buňkách je hladina p53 nízká, jeho hladina stoupá v případě poškození DNA. Aktivovaný p53 spustí transkripci p21, který funguje jako inhibitor cyklin-dependentních kinas, a tím zataví dělení buňky, dokud není poškozené místo opraveno. V případě neúspěšné reparace je navozena apoptosa.

1.4.4. Retinoblastomový protein

Retinoblastomový tumorsupresorový gen ve své fyziologické podobě kóduje fosfoprotein (pRb), který je zodpovědný za regulaci buněčného cyklu, diferenciaci, apoptosu a také za progresi nádorů ^{98,99}.

Hlavní biologickou funkcí pRb je negativní regulace buněčného cyklu zprostředkovaná inhibicí transkripčního faktoru E2F, který ovlivňuje přechod z G₁- do S-fáze buněčného cyklu (Obr. 8). Hypofosforylovaný pRb vazbou na E2F potlačuje expresi genů nezbytných pro přechod do S-fáze, jeho hyperfosforylace zase uvolní navázaný E2F, který se poté váže na DNA a mění expresi cílových genů, díky kterým je buňka schopna přejít do S-fáze buněčného cyklu. Patologická hyperfosforylace pRb spojená s deregulací buněčného cyklu se vyskytuje u širokého spektra malignit ¹⁰⁰.



Obr. 8 – Funkce retinoblastomového proteinu (pRb) ¹⁰⁶. Hyperfosforylace pRb uvolní navázaný E2F, který se poté naváže na DNA a mění expresi cílových genů.

1.4.5. RAS

RAS je protein s GTPasovou aktivitou o molekulové velikosti 21 kDa, který hraje důležitou roli při přenosu mitogenních signálů z extracelulárního prostředí do nitra buňky, neboť proteiny rodiny RAS jsou spojeny s vnitřním povrchem cytoplasmatické membrány a fungují jako intermediáty v signálních kaskádách, které regulují buněčnou proliferaci. RAS se vyskytuje se dvou formách – aktivní (s navázaným guanosintrifosfátem - GTP) a neaktivní (s navázaným guanosindifosfátem - GDP). K hydrolýze GTP na GDP dochází pomocí vnitřní (intrinsické) GTPasové aktivity. Proteiny rodiny GEF („*Guanine nucleotide exchange factors*“) usnadňují vazbu GTP k RAS, zatímco proteiny rodiny GAP („*GTPase-Activating Proteins*“) zesilují intrinsickou GTPasovou aktivitu proteinu. RAS tedy funguje jako přepínač pro signály z proximální komponenty na efektorové proteiny signálních kaskád^{2,100}.

Rodina proteinů RAS zahrnuje tři vysoce homologní proteiny H-RAS („*Harvey*“), K-RAS („*Kirsten*“), N-RAS („*neuroblastoma*“) a celou řadu příbuzných proteinů. Tyto malé GTPasové proteiny mají nezastupitelnou funkci v regulaci aktinu a přestavbě cytoskeletu. Zvýšená aktivace a/nebo deregulace zvyšuje motilitu, podporuje invazivitu a metastazování nádorových buněk. RAS spolu s p53 patří mezi nejčastěji mutované proteiny u solidních nádorů¹⁰⁰.

2. Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce je studium exprese proteinů podílejících se na vzniku rezistence u lidských neuroblastomových buněčných linií. Práce je zaměřena na studium vlivu cytostatik cisplatiny, doxorubicinu a ellipticinu na buněčnou linii UKF-NB-4 a od ní odvozené linie rezistentní k cisplatině UKF-NB-4^{CDDP}, doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO} a ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI}. V rámci této práce byly řešeny následující problematiky:

Studium exprese proteinu p53, retinoblastomového proteinu, proteinu RAS, cytochromů P450 1A1, 2D6, 3A4 a cytochromu b₅ v buněčných liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} vystavených působení cytostatik po dobu 24, 48 a 72 hodin metodou Western blot.

Studium genové exprese proteinu p53, retinoblastomového proteinu, proteinu H-RAS a cytochromů P450 2D6, 3A4 v buněčných liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} vystavených působení cytostatik po dobu 48 a 72 hodin metodou kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR).

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Biologický materiál

Lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP} a UKF-NB-4^{DOXO} byly darem prof. MUDr. Jindřicha Činátla, Goetheho Univerzita (Centrum hygieny, Institut medicínské virologie), Frankfurt nad Mohanem, Německo.

Lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4^{ELLI} byly darem prof. MUDr. Tomáše Eckschlagera, CSc., 2. LF UK a FN Motol (Klinika dětské hematologie a onkologie), Praha, Česká republika.

3.1.2. Chemikálie

2-merkaptoethanol	- Fluka, Švýcarsko
Agarosa	- Invitrogen, USA
Akrylamid	- Fluka, Švýcarsko
BCIP/NBT (vyvolávací tableta)	- Sigma-Aldrich [®] , USA
Bicinchoninová kyselina (BCA)	- Sigma-Aldrich [®] , USA
Bromfenolová modř	- Penta, Česká republika
Cisplatina	- Pliva, Česká republika
Complete (inhibitor proteas)	- Roche, Německo
Coomassie brilliant blue	- Serva, Německo
Dekahydrát uhličitanu sodného	- Lachema Brno, Česká republika
Deoxycholát sodný	- Sigma-Aldrich [®] , USA
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	- Lachema Brno, Česká republika
Dimethylsulfoxid (DMSO)	- AppliChem, Německo
Dodecylsulfát sodný (SDS)	- Sigma-Aldrich [®] , USA
Doxorubicin "Ebewe" 2 mg/ml	- EBEWE Pharma Ges.m.b.H. Nfg.KG, Rakousko
Ellipticin	- Sigma-Aldrich [®] , USA
Ethanol	- Lachema Brno, Česká republika
Fetální hovězí sérum	- HyClone [™] - Thermo Scientific [™] , USA
Fosfátový pufr s chloridem sodným (PBS)	- Gibco [®] - Life Technologies, USA

Glycerol	- Penta, Česká republika
Glycin	- Fluka, Švýcarsko
Hovězí sérový albumin (BSA)	- Sevapharma, a.s, Česká republika
Hydrát uhličitanu sodného	- Lachema Brno, Česká republika
Hydrogenuhlíčan sodný	- Lachema Brno, Česká republika
Hydroxid sodný	- Penta, Česká republika
Chlorid sodný	- Lachema Brno, Česká republika
Chloroform	- Penta, Česká republika
Igepal CA 630	- Sigma-Aldrich [®] , USA
„Iscove's Modified Dulbecco's Medium“ (IMDM)	- HyClone™ - Thermo Scientific™, USA
Isopropanol	- Lachema Brno, Česká republika
Kyselina boritá	- Penta, Česká republika
Kyselina ethylendiamintetraoctová	- Sigma-Aldrich [®] , USA
Kyselina chlorovodíková	- Lachema Brno, Česká republika
Kyselina octová	- Lachema Brno, Česká republika
„Loading Dye“	- Fermentas, Kanada
Methanol	- Fluka, Švýcarsko
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	- Serva, Německo
N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS)	- Fluka, Švýcarsko
Pentahydrát síranu měďnatého	- Lachema Brno, Česká republika
Persíran amonný	- Fluka, Švýcarsko
Ponceau	- Fluka, Švýcarsko
Primární protilátka proti CYP 1A1	- Merck Millipore, USA
Primární protilátka proti CYP 2D6	- Abcam, Anglie
Primární protilátka proti CYP 3A4	- Proteintech, USA
Primární protilátka proti cytochromu b ₅	- Abcam, Anglie
Primární protilátka proti fosfo-p53	- Biovision, USA
Primární protilátka proti pRb	- Merck Millipore, USA
Primární protilátka proti RAS	- Merck Millipore, USA

Sada pro reverzní transkripci na cDNA s inhibitorem RNAs („High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits with RNase Inhibitor“)	- Applied Biosystems® - Life Technologies, USA
Sada pro stanovení proteinů pomocí BCA („Microplate BCA Protein Assay Kit“)	- Pierce® - Thermo Scientific™, USA
Sekundární protilátka proti králičí s navázanou alkalickou fosfatasou („Anti-Rabbit IgG whole molecule – AP Conjugate“)	- Sigma-Aldrich®, USA
Sekundární protilátka proti králičí s navázanou alkalickou fosfatasou („Goat anti-mouse IgG H+L - AP Conjugate“)	- Bio-Rad, USA
Standard pro agarosovou elektroforézu („Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker“)	- Fermentas, USA
Standard pro SDS elektroforézu a WB („Multicolor broad range“)	- Spectra™ - Fermentas, USA
Sušené mléko Milli - odtučněné „TaqMan® Gene Expression Assay“	- Friesland ČR, a.s., Česká republika
„TaqMan® Gene Expression Master Mix“	- Applied Biosystems® - Life Technologies, USA - Applied Biosystems® - Life Technologies, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	- Fluka, Švýcarsko
Triton X-100	- Serva, Německo
TRIzol®	- Applied Biosystems® - Life Technologies, USA
Trypsin-EDTA 10x	- PAA, Rakousko
Vínan sodno-draselný	- Lachema Brno, Česká republika
Voda zbavená RNAs („RNase free“)	- Ambion® - Life Technologies, USA

Všechny používané chemikálie byly čistoty p.a., pokud není uvedeno jinak.

3.1.3. Další materiál

Centrifugační zkumavky typu Falcon	- TPP, Švýcarsko
Kryozkumavky	- Corning Incorporated, USA
Kultivační láhve	- TPP, Švýcarsko
Kultivační misky	- TPP, Švýcarsko
Kultivační škrabka	- TPP, Švýcarsko
Nitrocelulosová membrána 0,2 μm	- Bio-Rad, USA

3.2. Metody

3.2.1. Rozmrazení buněk

Buněčné suspenze, které byly uchovávány v kryozkumavkách v -80°C , byly rozmrazeny ve vodní lázni (37°C), přeneseny do 15ml zkumavek a k nim bylo přidáno 5 ml „Iscove's Modified Dulbecco's Medium“ s glutaminem (IMDM) doplněného 10% (v/v) fetálním hovězím sérem (FBS) (kompletní medium). Následně byla provedena centrifugace při 1 200 rpm po dobu 2 minut při pokojové teplotě v centrifuze Universal 320R, Hettich (Anglie). Supernatant byl odebrán a peleta buněk byla resuspendována v 10 ml kompletního kultivačního média. Buněčná suspenze byla přenesena do kultivační láhve (25 cm^2) a buňky byly pěstovány při 37°C , 5% CO_2 a 95% vlhkosti vzduchu v inkubátoru SHEL LAB (USA).

3.2.2. Kultivace buněk

Lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 senzitivní a linie rezistentní k ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI}, cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} a doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO} byly kultivovány v IMDM médiu doplněném 10% (v/v) FBS. Kultivace probíhala při 37°C , 5% CO_2 a 95% vlhkosti vzduchu v inkubátoru SHEL LAB (USA) v kultivačních lahvích (25 cm^2 a 75 cm^2).

3.2.3. Pasážování buněk

Konfluence buněk byla ověřována mikroskopem Motic® AE31, Ted Pella, Inc. (USA). Buňky byly pasážovány v pravidelných intervalech (1x – 2x týdně) optimálně při dosažení pokrytí kultivační plochy.

Nejprve bylo z kultivační láhve odstraněno kultivační médium a dno láhve bylo 2x omyto roztokem PBS. Adherované buňky byly z povrchu kultivační láhve uvolňovány

0,05% Trypsin-EDTA v PBS. Trypsinace probíhala 10 minut při 37°C v inkubátoru SHEL LAB (USA). Část buněčné suspenze byla resuspendována v potřebném množství kompletního kultivačního média (10 ml pro 25 cm² kultivační plochy a 20 ml pro 75 cm² kultivační plochy).

V případě rezistentních buněčných linií UKF-NB-4^{ELLI}, UKF-NB-4^{CDDP} a UKF-NB-4^{DOXO} bylo do média přidáno příslušné cytostatikum dle Tab. 1. Koncentrace příslušných cytostatik byly zvoleny tak, aby linie nezahubily, ale zároveň aby u nich byla udržována rezistence. Následně byly buněčné linie pěstovány dle kapitoly 3.2.2. na straně 34.

Tab. 1 - Koncentrace cytostatik přidávaných k rezistentním lidským neuroblastomovým liniím při pasážování.

Buněčná linie	Cytostatikum	Koncentrace cytostatika v kultivačním médiu
UKF-NB-4 ^{ELLI}	ellipticin	2,5 µM
UKF-NB-4 ^{CDDP}	cisplatina	1000 ng/ml
UKF-NB-4 ^{DOXO}	doxorubicin	50 ng/ml

3.2.4. Příprava vzorků buněčných linií

Poté, co byly rezistentní buněčné linie minimálně 2x pasážovány a následně kultivovány s přidavkem cytostatika (viz Tab. 1) a linie bez rezistence minimálně 2x pasážována od jejich rozmrazení, byly při následujícím pasážování (dle kap. 3.2.3) přeneseny do Petriho misek. Při této pasáži nebyla cytostatika přidána k rezistentním liniím.

Při dosažení optimálního pokrytí kultivační plochy buňkami (asi 80 % pro inkubaci 24 hodin, 60% pro inkubaci 48 hodin a 50 % pro inkubaci 72 hodin) bylo k buňkám přidáno příslušné cytostatikum, se kterým byly linie inkubovány 24, 48 a 72 hodin pro metodu Western blot a 48 a 72 hodin pro kvantitativní polymerasovou řetězovou reakci v reálném čase (RT-PCR) při 37°C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti vzduchu v inkubátoru SHEL LAB (USA). Jako kontrola byly použity linie bez přidavku příslušného cytostatika. V případě linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} byla jako druhá kontrola použita linie s přidavkem dimethylsulfoxidu (DMSO), neboť DMSO bylo užito jako rozpouštědlo pro ellipticin. Kultivace buněk s cytostatiky je shrnuta v tabulce 2 na straně 36.

Takto připravené buněčné linie byly pomocí škrabky uvolněny z povrchu kultivační Petriho misky. Buněčná suspenze byla přenesena pipetou do centrifugační zkumavky a byla provedena centrifugace při 1 200 rpm po dobu 2 minut při pokojové teplotě v centrifuze Universal 320R, Hettich (Anglie). Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla promyta 2x 1 ml PBS, následně centrifugována při 1 200 rpm po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla skladována v -20°C v mrazicím boxu.

Tab. 2 – Přehled vzorků buněčné linie UKF-NB-4 senzitivní a linií rezistentních k cisplatině UKF-NB-4^{CDDP}, doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO} nebo ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} následně testovaných metodou Western blot a kvantitativní polymerasovou řetězovou reakcí v reálném čase (RT-PCR).

Buňky byly s jednotlivými cytostatiky kultivovány po dobu 24, 48 a 72 hodin pro metodu Western blot a 48 a 72 hodin pro RT-PCR. Jako kontrolní byly připraveny linie bez přídavku cytostatika, případně s přídavkem DMSO. CDDP – cisplatina, DMSO – dimethylsulfoxid, DOXO – doxorubicin, ELLI – ellipticin.

Buněčná linie	Cytostatikum
UKF-NB-4	Kontrola
UKF-NB-4	CDDP (1000 ng/ml)
UKF-NB-4 ^{CDDP}	Kontrola
UKF-NB-4 ^{CDDP}	CDDP (1000 ng/ml)
UKF-NB-4	DOXO (50 ng/ml)
UKF-NB-4 ^{DOXO}	Kontrola
UKF-NB-4 ^{DOXO}	DOXO (50 ng/ml)
UKF-NB-4	DMSO (2,5% v/v; kontrola)
UKF-NB-4	ELLI (2,5 µM)
UKF-NB-4 ^{ELLI}	Kontrola
UKF-NB-4 ^{ELLI}	DMSO (2,5% v/v; kontrola)
UKF-NB-4 ^{ELLI}	ELLI (2,5 µM)

3.2.5. Izolace proteinů z buněčných pelet

RIPA pufr: 1% (v/v) Igepal CA 630; 0,5% (w/v) deoxycholát sodný; 0,1% (w/v) SDS; v PBS

Peleta dané buněčné linie pro analýzu proteinů pomocí metody Western blot připravena dle kap. 3.2.4. (na straně 35) byla resuspendována ve dvojnásobném objemu pufru RIPA

s proteasovým inhibitorem Complete. Buněčná suspenze byla inkubována na ledu 60 minut a poté centrifugována při 4 °C po dobu 20 minut při 16 100 rpm v centrifuze Microcentrifuge 5415R, Eppendorf (USA). Supernatant obsahující proteiny byl přenesen do nové mikrozkušavky a byl uchován v mrazicím boxu v -80 °C pro další použití.

3.2.6. Stanovení proteinů

Činidlo A, pH 11,25: 2% (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,95% (w/v) NaHCO_3 ; 0,4% (w/v) NaOH ; 0,16% (w/v) vlnan sodno-draselný

Činidlo B: 4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Koncentrace proteinů v celobuněčném lyzátu byla stanovena metodou BCA¹⁰¹ pomocí komerční sady Microplate BCA Protein Assay Kit, Pierce® - Thermo Scientific™ (USA). Každý vzorek byl připraven v tripletech ve dvou ředěních - 25x a 50x ředěný roztok proteinů v destilované vodě.

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 9 μl příslušného vzorku, standardu sérového hovězího albuminu (BSA) o koncentraci 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 a 2 mg/ml či slepého vzorku. Slepým vzorkem byla destilovaná voda a RIPA pufr. Ke každému vzorku bylo přidáno 260 μl činidla, které bylo připraveno bezprostředně před přidáváním – kyselina bicinchoninová (BCA) byla rozpuštěna v 50 dílech činidla A tak, aby její koncentrace v 51 dílech byla 1% (w/v); poté byl přidán 1 díl činidla B.

Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 30 minut při 37 °C v inkubátoru IR 1500 Automatic CO₂ incubator, Flow Laboratories (Anglie). Následně byla změřena absorbance vzorků při 562 nm pomocí čtečky mikrotitračních destiček a automaticky vyhodnocena příslušná koncentrace proteinů pomocí programu KIM 32.

3.2.7. SDS elektroforéza

10% dělicí gel: 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8; 10% (w/v) akrylamid/BIS (29:1); 0,1% (w/v) SDS; 0,001% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) APS

16% dělicí gel: 0,5625 M Tris/HCl, pH 8,8; 16% (w/v) akrylamid/BIS (29:1); 0,1% (w/v) SDS; 0,001% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) APS

6% zaostřovací gel: 0,16 M Tris/HCl, pH 6,8; 6% (w/v) akrylamid/BIS (29:1); 0,1% (w/v) SDS; 0,002% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) APS

Vzorkový pufr 4x koncentrovaný: 0,25 M Tris/HCl; 8% (w/v) SDS; 20% (v/v) 2-merkapt ethanol; 40% (v/v) glycerol; 0,004% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

Elektrodový pufr: 0,0278 M Tris; 0,276 M glycin; 0,1112 M SDS

Elektroforéza celobuněčných lyzátů obsahujících proteiny v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) byla prováděna dle Laemmliho¹⁰² na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním uspořádání za použití 6% zaostřovacího gelu a 10% nebo 16% separačního gelu. K jednotlivým vzorkům (15, 25 nebo 75 µg proteinů na jamku) byl přidán 4x koncentrovaný vzorkový pufr v poměru 3:1, vzorky byly následně 5 minut inkubovány ve vroucí vodní lázni a nanесeny Hamiltonovou stříkačkou do jamek gelu.

Dělení proteinů probíhalo v elektroforetické aparatuře firmy Bio-Rad (USA) ve vertikálním uspořádání 80 minut při pH 8,5 a konstantním proudu 20 mA na jednu elektroforetickou desku. Po elektroforetickém rozdělení byly proteiny přeneseny metodou Western blot na nitrocelulosovou membránu.

3.2.8. Western blot

Přenosový pufr: 0,0252 M Tris; 0,1915 M glycin

PBS Triton X-100: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄·10H₂O; 1 mM NaH₂PO₄, pH 7,2; 0,3% (w/v) Triton X-100

Blokovací roztok: 5% (w/v) odtučněné mléko v PBS Triton X-100

Barvicí lázeň: 0,25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250; 46% (v/v) ethanol; 9,2% (v/v) kyselina octová

Odbarvovací lázeň: 25% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kyselina octová

Po skončení SDS elektroforézy byly gel i nitrocelulosová membrána inkubovány 10 minut v přenosovém pufru s 10% (v/v) methanolem na třepačce IKA Yellow line OS2 basic (Německo) při laboratorní teplotě.

Do aparatury pro WB MiniVE Blotter, Hoefer (USA) byly postupně vrstveny „fiber“, filtrační papír, nitrocelulosová membrána (0,2 µm), elektroforetický gel, opět filtrační papír a „fiber“. Membrány spolu s gely, „fibery“ a filtračními papíry byly ponořeny do přenosového pufru s 10% (v/v) methanolem. Přenos proteinů probíhal 80 minut při konstantním proudu 350 mA.

Po elektropřenosu byla membrána nejprve barvena roztokem Ponceau (0,5% (v/v) Ponceau; 1% (v/v) kyselina octová) pro kontrolu správného přenosu proteinů, poté byl roztok Ponceau z membrány odmyt destilovanou vodou a membrána byla inkubována v blokovacím roztoku 1 hodinu na třepačce IKA Yellow line OS2 basic (Německo)

při laboratorní teplotě pro zajištění omezení nespecifických interakcí mezi proteiny a primární protilátkou. Následně byla nitrocelulosová membrána inkubována se specifickou primární protilátkou (Tab. 3) přes noc při 4°C za stálého míchání pomocí Mini-Rocker Shaker MR-1, Biosan (Litva).

Tab. 3 – Ředění primární protilátky v blokovacím roztoku

Primární protilátka proti	Ředění primární protilátky v blokovacím roztoku
CYP 1A1	1:500
CYP 3A4	1:600
CYP 2D6	1:333
b ₅	1:750
p53	1:333
RAS	1:1000
pRb	1:200000

V přístroj SNAP i.d. Millipore (USA) byla odmyta primární protilátky pufrém PBS Triton X-100 (3 x 10 ml) a membrána byla inkubována se sekundární protilátkou 10 minut při laboratorní teplotě; kozí IgG proti králíčí IgY (finální ředění protilátky roztokem PBS Triton X-100 3:1428,7) nebo kozí IgG proti myší IgY (finální ředění protilátky roztokem PBS Triton X-100 3:1500) obě s navázanou alkalickou fosfatase. Sekundární protilátka byla z membrány odmyta pufrém PBS Triton X-100 (3 x 10 ml).

Detekce proteinů byla provedena roztokem substrátu pro alkalickou fosfatase (BCIP/NBT) v 10 ml destilované vody, reakce byla zastavena smočením membrány v destilované vodě.

Pro ověření správného přenosu proteinů z gelu na membránu byl gel po elektropřenosu barven v barvicí lázni 1 hodinu na třepačce IKA Yellow line OS2 basic (Německo) při laboratorní teplotě a následně byl gel zbaven přebytečné Coomassie brilliant blue R-250 v odbarvovací lázni.

3.2.9. Izolace RNA

Vzorky buněčných linií byly připraveny a sklizeny dle kap. 3.2.4. na straně 35. Linie byly inkubovány s cytostatiky 48 a 72 hodin. Buněčné pelety byly resuspendovány v TRIzol[®] (1 ml na 10 cm² kultivační plochy) a 5 minut inkubovány při laboratorní teplotě.

Následně bylo přidáno 200 µl chloroformu na 1 ml TRIzol, vzorky byly 15 sekund míchány na vortexu, 3 minuty inkubovány při pokojové teplotě a poté centrifugovány při 4°C po dobu 15 minut při 12 000 rpm v centrifuze Microcentrifuge 5415R, Eppendorf (USA). Supernatant obsahující RNA byl přenesen do nové mikrozkušavky a naředěn 100% isopropanolem v poměru 1:1. Dále byly vzorky inkubovány 10 minut při pokojové teplotě a následně centrifugovány při 4°C po dobu 15 minut při 12 000 rpm. Pelety byly promyty 1 ml 75% (v/v) ethanolu, vzorky byly důkladně vortexovány a centrifugovány při 4°C po dobu 5 minut při 7 600 rpm. Pelety byly sušeny 2 minuty při 60°C v termobloku VLM LS1 (Německo), poté resuspendovány ve 40 µl vody (RNase free) a uchovány v mrazicím boxu v -80°C pro další použití. Čistota a koncentrace izolované RNA byla měřena na spektrofotometru NanoVue Plus, GE Healthcare Life Science (Anglie) a ověřena agarosovou elektroforézou.

3.2.10. Agarosová elektroforéza

TBE zásobní pufr 5x koncentrovaný: 445 mM Tris; 445 mM kyselina boritá; 10 mM EDTA; pH 8 – 8,3

Čistota izolované RNA (izolace RNA viz kap. 3.2.9. na straně 39) byla ověřena agarosovou elektroforézou.

Byl připraven roztok 1% (w/v) agarosy v 10x ředěném zásobním TBE pufru. Agarosa byla rozpuštěna ohřevem v mikrovlnné troubě za občasného promíchání a po jejím ochlazení (přibližně na 40 - 45°C) byl roztok nalit do elektroforetické vany, kam byly upevněny hřebeny pro nanášení vzorků. Po ztuhnutí gelu byla vana s gelem umístěna do elektroforetické aparatury Cleaver Scientific (Anglie) a převrstvena 10x ředěným zásobním TBE puftrem. Do jamek byly nanášeny po 6 µl vzorky zředěné vzorkovým puftrem Loading dye 1:5 a marker (1 µl Lambda EcoRI + HindIII, 4 µl vody – RNase free, 1 µl 6x Loading Dye).

Elektroforéza RNA probíhala v horizontálním uspořádání 40 minut při napětí 110 V. Po ukončení elektroforézy byl gel umístěn na transiluminátor Dark Reader® Clare Chemical Resarch (USA) a přenesen do temné místnosti, kde byla RNA vizualizována.

3.2.11. Reverzní transkripce

Pro přepis RNA do komplementární DNA (cDNA) byla použita komerční sada pro reverzní transkripci na cDNA s inhibitorem RNAs (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, Applied Biosystems).

Vzorky RNA izolované dle kap. 3.2.9. na straně 39 byly ředěny vodou (RNase free) tak, aby koncentrace RNA ve 12 μ l byla 1 μ g. Ke každému vzorku bylo přidáno 9 μ l reakční směsi (2 μ l 10x RT pufr, 0,8 μ l 25x dNTP Mix – 100 mM, 2 μ l RT náhodných primerů, 1 μ l MultiScribe™ reversní transkriptasy, 1 μ l inhibitoru RNAs a 3,2 μ l vody zbavené nukleas), jako kontrola byly použity vzorky bez přídavku reverzní transkriptasy.

Pro přepis RNA do cDNA byly vzorky umístěny do termocykleru Techgene, Techne, Taylor Scientific (USA) a byl zvolen následující program:

25°C po dobu 10 minut

37°C po dobu 120 minut

85°C po dobu 5 minut

4°C ∞ .

3.2.12. Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR)

Reakce RT-PCR byla provedena se vzorky inkubovanými s cytostatiky 48 a 72 hodin s próbami TaqMan® Gene Expression Assay specifickými pro CYP 1A1, 2D6, H-RAS, pRB1, p53 a B2M (referenční gen).

Vzorky cDNA připravené dle kap. 3.2.11. byly 10x naředěny (RNase free vodou) stejně jako kontroly bez přídavku reverzní transkriptasy. Následně bylo přidáno 5 μ l vzorku do 15 μ l předem připravené směsi (10 μ l TaqMan® Gene Expression Master Mix, 4 μ l RNase free vody, 1 μ l TaqMan® Gene Expression Assay). Každý vzorek byl analyzován ve dvou paralelních stanoveních.

Vzorky byly vloženy do Real-Time cykleru Rotor Gene 2000, Qiagen (Německo), kde byly pomocí programu Rotor Gene 5 nastaveny následující podmínky:

50°C po dobu 2 minut

95°C po dobu 10 minut.

Poté bylo nastaveno 50 cyklů v následujících parametrech:

95°C po dobu 15 sekund

60°C po dobu 120 sekund.

Data byla vyhodnocena programem Rotor Gene 5, který určil hodnoty C_T , tedy číslo cyklu, ve kterém došlo k signifikantnímu nárůstu fluorescence.

Ze dvou paralelních stanovení byl spočítán průměr $C_T(p53)$, $C_T(pRb)$, $C_T(H-RAS)$, $C_T(2D6)$ a $C_T(B2M)$ a následně exprese sledovaného genu v porovnání s referenčním genem (B2M) dle vzorce $\Delta C_T = C_T(\text{sledovaný gen}) - C_T(B2M)$. Míra indukce exprese sledovaného genu ve vzorcích buněčných linií vystavených působení cytostatika oproti kontrolním liniím (bez přídavku cytostatika) byla vyjádřena jakožto násobek kontroly dle vzorce $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\Delta C_T^{\text{cytostatikum}} - \Delta C_T^{\text{kontrola}})}$.

4. Výsledky

Rezistence nádorových onemocnění k podávaným cytostatikům je jednou z největších komplikací protinádorové chemoterapie.

Předkládaná diplomová práce srovnává hladiny exprese proteinu p53, retinoblastomového proteinu, proteinu RAS, cytochromů P450 1A1, 2D6, 3A4 a cytochromu b₅ v lidských neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4 a liniích rezistentních k cisplatině (UKF-NB-4^{CDDP}), doxorubicinu (UKF-NB-4^{DOXO}) a ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}) na proteinové úrovni pomocí metody Western blot a na úrovni genové exprese pomocí kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) porovnává hladiny exprese p53, pRb, H-RAS a CYP 2D6. Rozdílná exprese studovaných proteinů v parentální linii a od ní odvozených linií rezistentních k cisplatině, doxorubicinu nebo ellipticinu může přispět k vysvětlení špatné odpovědi pacientů vůči podávaným cytostatikům.

Nádorové neuroblastomové buněčné linie byly vystaveny působení příslušného cytostatika po dobu 24, 48 a 72 hodin pro stanovení metodou Western blot a 48 a 72 hodin pro stanovení metodou RT-PCR. Míra exprese studovaných proteinů byla porovnávána se vzorky neuroblastomových buněčných linií připravených bez přídavku cytostatika, případně s přídavkem dimethylsulfoxidu v případě UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}, neboť DMSO byl použitým rozpouštědlem pro ellipticin. Byly zvoleny takové koncentrace jednotlivých cytostatik (Tab. 2 na straně 36), při kterých je udržována rezistence příslušných linií.

4.1. Western blot

V první části práce byl testován vliv cytostatik, konkrétně cisplatin, doxorubicinu nebo ellipticinu na expresi vybraných proteinů metodou Western blot.

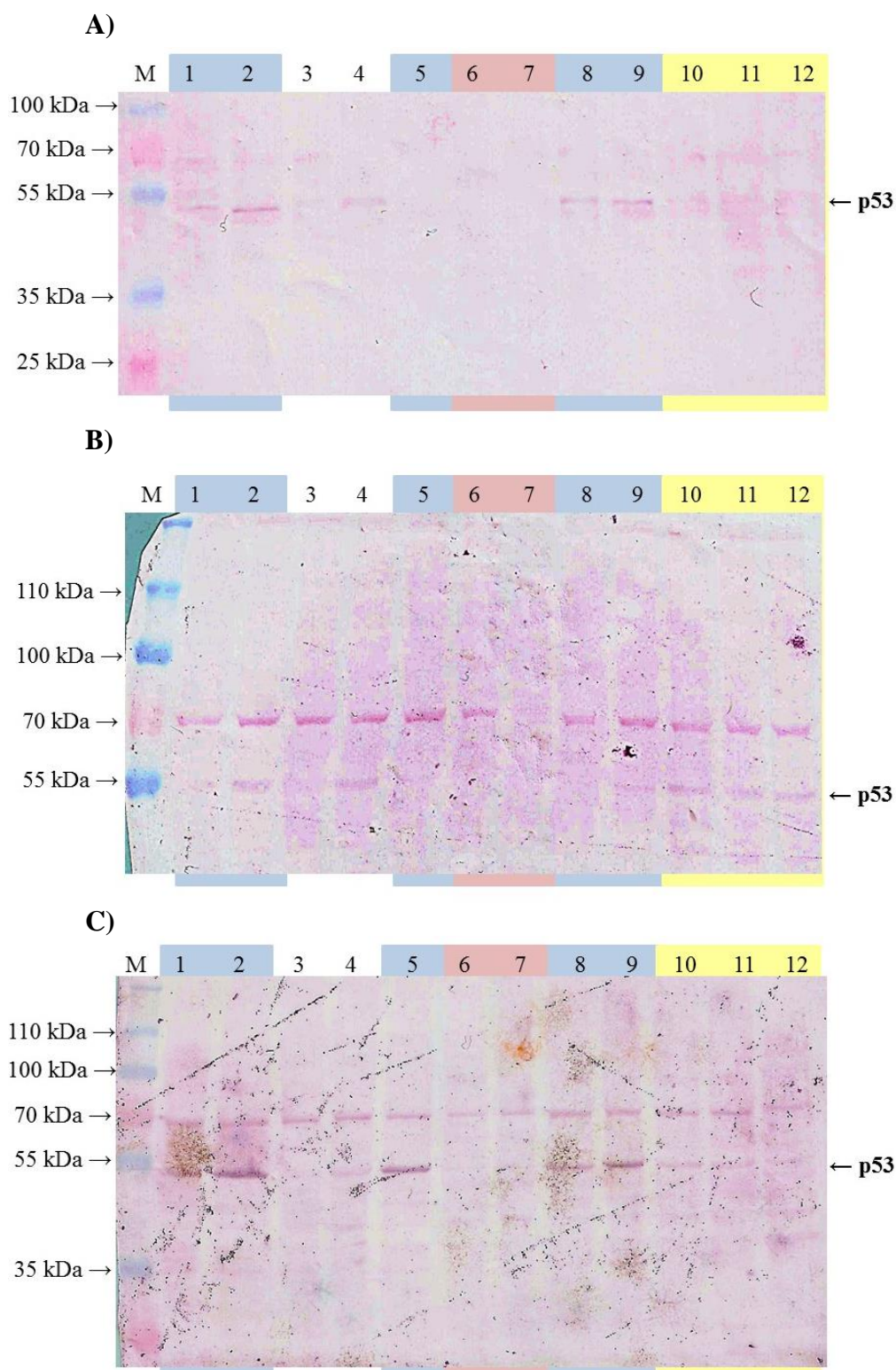
4.1.1. Detekce hladiny proteinu p53

Vzorky neuroblastomových buněčných linií připravených podle kap. 3.2.4. na straně 35 byly nanášeny na polyakrylamidový gel v koncentraci 75 µg proteinů na jamku.

Z Obr. 9A a 9B (na straně 45) je patrné, že 24 ani 48 hodinová inkubace neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} s jednotlivými studovanými cytostatiky nevykazovala větší změny v expresi proteinu p53 (53 kDa). Mírně vyšší exprese proteinu p53 byla znatelná po 24

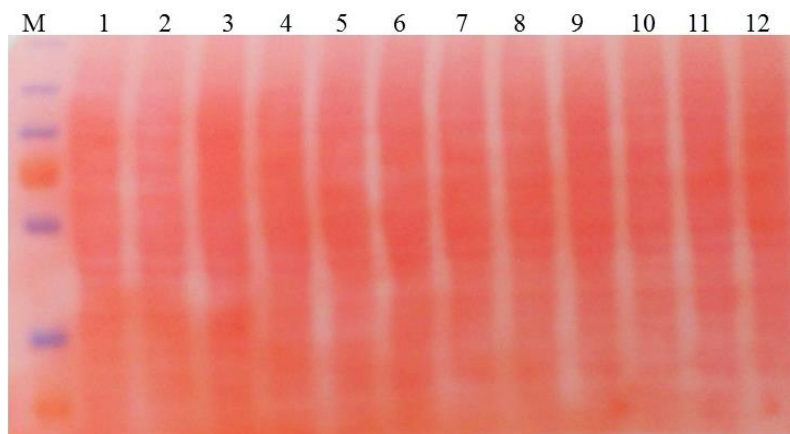
hodinové inkubaci senzitivní linie UKF-NB-4 s cisplatinou (1000 $\mu\text{g/ml}$), dimethylsulfoxidem či ellipticinem (2,5 μM). Výraznější změna byla pozorována až po 72 hodinové inkubaci senzitivní neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 s jednotlivými cytostatiky, jak je patrné z obrázku 9C na straně 45 (podbarveno modře). Nejvyšší hladina proteinu p53 byla detekována v buňkách vystavených cisplatině o koncentraci 1000 ng/ml. Neuroblastomové buněčné linie vystavené doxorubicinu (50 ng/ml) nebo ellipticinu (2,5 μM) vykazovaly srovnatelně zvýšené hladiny proteinu p53. Množství proteinu p53 je lehce zvýšeno po 72 hodinovém vystavení UKF-NB-4 i dimethylsulfoxidu. Přidáním sledovaných cytostatik k rezistentním liniím UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} nebo UKF-NB-4^{ELLI} nebyla zaznamenána změna exprese proteinu p53 ani po 72 hodinové kultivaci s příslušnými cytostatiky.

Množství přenesených proteinů v jednotlivých jamkách po 72 hodinové inkubaci s cytostatiky je uvedeno na Obr. 10, strana 46. Nitrocelulosová membrána byla po přenosu proteinů z gelu na membránu barvena Ponceau.



Obr. 9 – Detekce exprese proteinu p53 v buněčných liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} inkubovaných s příslušnými cytostatiky 24 hodin (A), 48 hodin (B) a 72 hodin (C).

M – standard molekulových hmotností, 1 – UKF-NB-4, 2 – UKF-NB-4 + CDDP, 3 – UKF-NB-4^{CDDP}, 4 – UKF-NB-4^{CDDP} + CDDP, 5 – UKF-NB-4 + DOXO, 6 – UKF-NB-4^{DOXO}, 7 – UKF-NB-4^{DOXO} + DOXO, 8 – UKF-NB-4 + DMSO, 9 – UKF-NB-4 + ELLI, 10 – UKF-NB-4^{ELLI}, 11 – UKF-NB-4^{ELLI} + DMSO, 12 – UKF-NB-4^{ELLI} + ELLI; CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 μ M).



Obr. 10 – Nitrocelulosoová membrána barvená Ponceau – vizualizace přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosoovou membránu metodou Western blot. Po odmytí Ponceau byla tato membrána inkubována s primární protilátkou proti p53 a je uvedena na obrázku 8C.

M – standard molekulových hmotností, 1 – UKF-NB-4, 2 - UKF-NB-4 + CDDP, 3 – UKF-NB-4^{CDDP}, 4 - UKF-NB-4^{CDDP} + CDDP, 5 – UKF-NB-4 + DOXO, 6 - UKF-NB-4^{DOXO}, 7 – UKF-NB-4^{DOXO} + DOXO, 8 - UKF-NB-4 + DMSO, 9 – UKF-NB-4 + ELLI, 10 - UKF-NB-4^{ELLI}, 11 - UKF-NB-4^{ELLI} + DMSO, 12 - UKF-NB-4^{ELLI} + ELLI; CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 μ M).

4.1.2. Detekce hladiny retinoblastomového proteinu

Proteiny izolované ze vzorků buněčných linií byly nanášeny na polyakrylamidový gel o celkové koncentraci 15 μ g proteinů na jamku. Po elektroforetickém rozdělení na gelu byly proteiny přeneseny na nitrocelulosoovou membránu pro následnou detekci exprese fosforylovaného retinoblastomového proteinu.

Na obrázku 11 na straně 48 jsou zjevné rozdíly mezi různě dlouhými kultivacemi buněčných linií s cytostatiky. Nejvýznamnější změny v expresi proteinu pRb (110 kDa) byly zaznamenány po 72 hodinové inkubaci buněk s cisplatinou, doxorubicinem nebo ellipticinem (Obr. 11C, strana 48), kde je patrná snížená exprese pRb v buněčných liniích vystavených všem cytostatikům. Nejnižší hladina pRb byla detekována u senzitivní linie UKF-NB-4 inkubované s ellipticinem (2,5 μ M), snížená exprese byla zaznamenána také v senzitivní linii UKF-NB-4 inkubované s doxorubicinem (50 ng/ml) nebo s cisplatinou (1000 ng/ml).

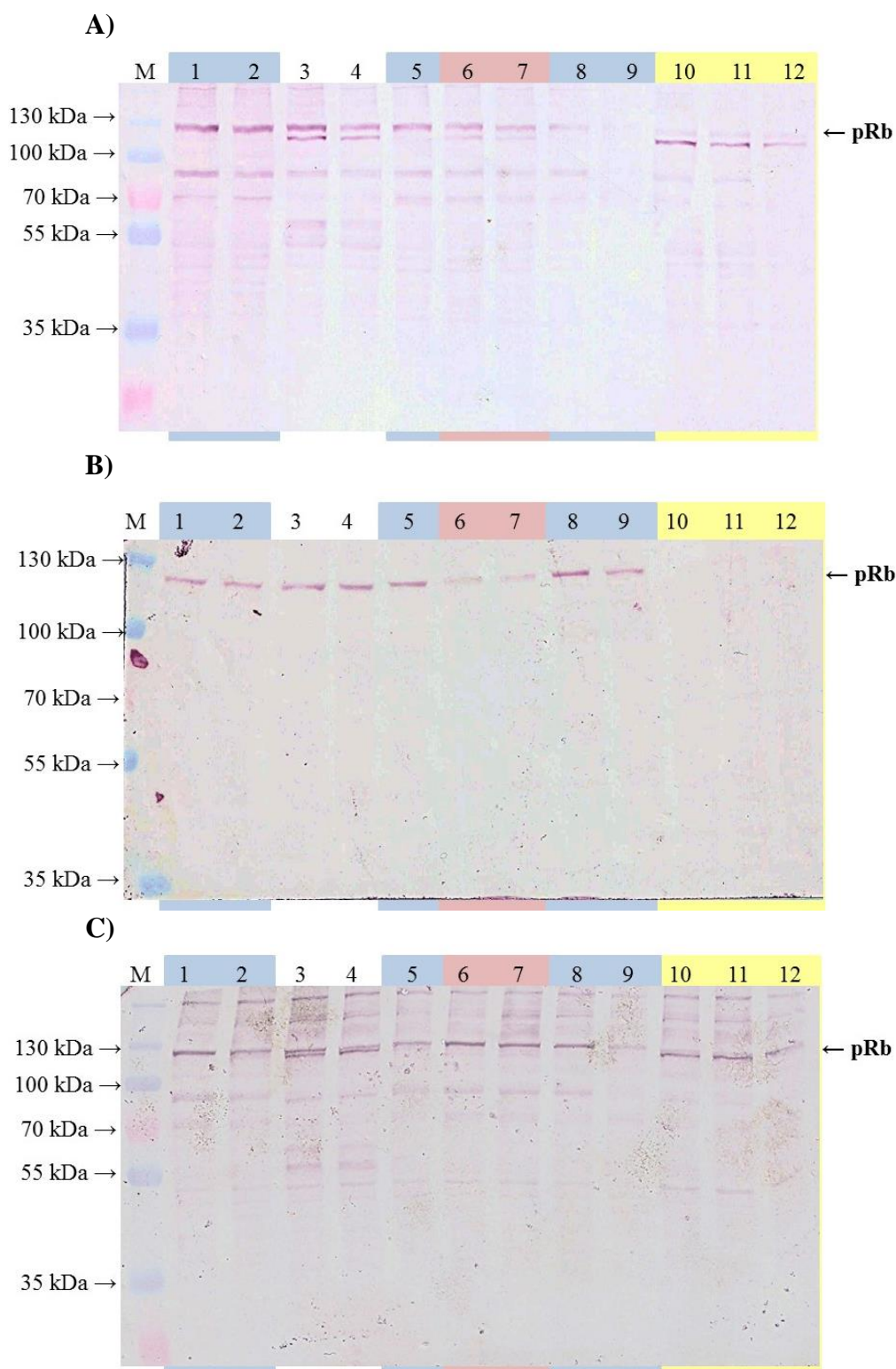
Podobně nízkou expresi retinoblastomového proteinu vykazovala i rezistentní linie UKF-NB-4^{ELLI} po 72 hodinové kultivaci se stejnou koncentrací ellipticinu.

Již po 24 hodinové inkubaci neuroblastomových buněčných linií s jednotlivými cytostatiky jsou patrné rozdíly v expresi pRb, podobně jako tomu je v případě 72 hodinové kultivace se studovanými cytostatiky, avšak ne v takové míře (Obr. 11A, strana 48). Největší

pokles exprese vykazovala opět senzitivní linie UKF-NB-4 vystavená působení ellipticinu. Nepatrně nižší exprese byla zaznamenána také u rezistentní linie UKF-NB-4^{ELLI} v přítomnosti ellipticinu. Oproti parentální linii vykazovala nižší expresi pRb též senzitivní linie UKF-NB-4 inkubovaná s doxorubicinem.

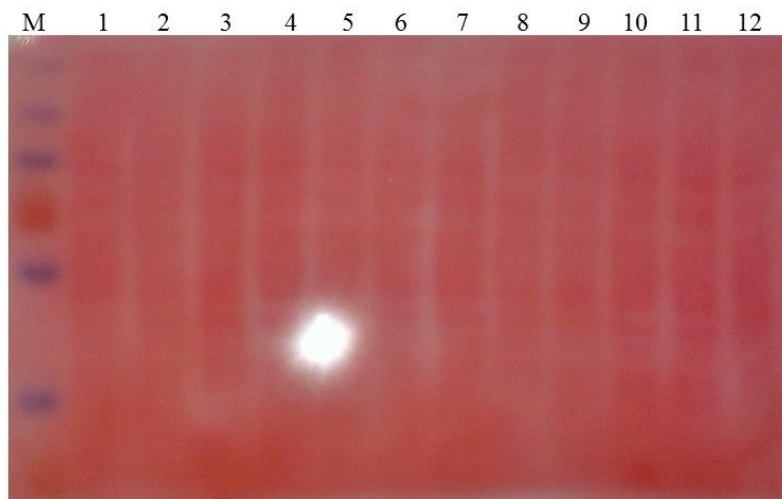
Výsledky exprese pRb ve vzorcích vystavených 48 hodinovému působení cytostatik (Obr. 11B, strana 48) nejsou považovány za relevantní. Nejen že neodpovídají předešlým výsledkům, ale také při kontrole přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu pomocí barvení Ponceau byly zaznamenány nerovnoměrné koncentrace nanesených proteinů na gel, a to v případě kontrolní linie UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{DOXO} inkubované s doxorubicinem. U žádného ze vzorků UKF-NB-4^{ELLI} nebyl detekován pRb.

Na obrázku 12 na straně 49 je uvedena nitrocelulosová membrána barvená Ponceau po přenosu proteinů (izolovaných z buněčných linií vystavených jednotlivým cytostatikům 72 hodin) z gelů na membrány pro vizualizaci množství přenesených proteinů.



Obr. 11 – Detekce exprese proteinu pRb v buněčných liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} inkubovaných s příslušnými cytostatiky 24 hodin (A), 48 hodin (B) a 72 hodin (C).

M – standard molekulových hmotností, 1 – UKF-NB-4, 2 – UKF-NB-4 + CDDP, 3 – UKF-NB-4^{CDDP}, 4 – UKF-NB-4^{CDDP} + CDDP, 5 – UKF-NB-4 + DOXO, 6 – UKF-NB-4^{DOXO}, 7 – UKF-NB-4^{DOXO} + DOXO, 8 – UKF-NB-4 + DMSO, 9 – UKF-NB-4 + ELLI, 10 – UKF-NB-4^{ELLI}, 11 – UKF-NB-4^{ELLI} + DMSO, 12 – UKF-NB-4^{ELLI} + ELLI; CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 μ M).



Obr. 12 – Nitrocelulosevá membrána barvená Ponceau – vizualizace přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosevou membránu metodou Western blot. Po odmytí Ponceau byla tato membrána inkubována s primární protilátkou proti pRb a je uvedena na obrázku 10C.

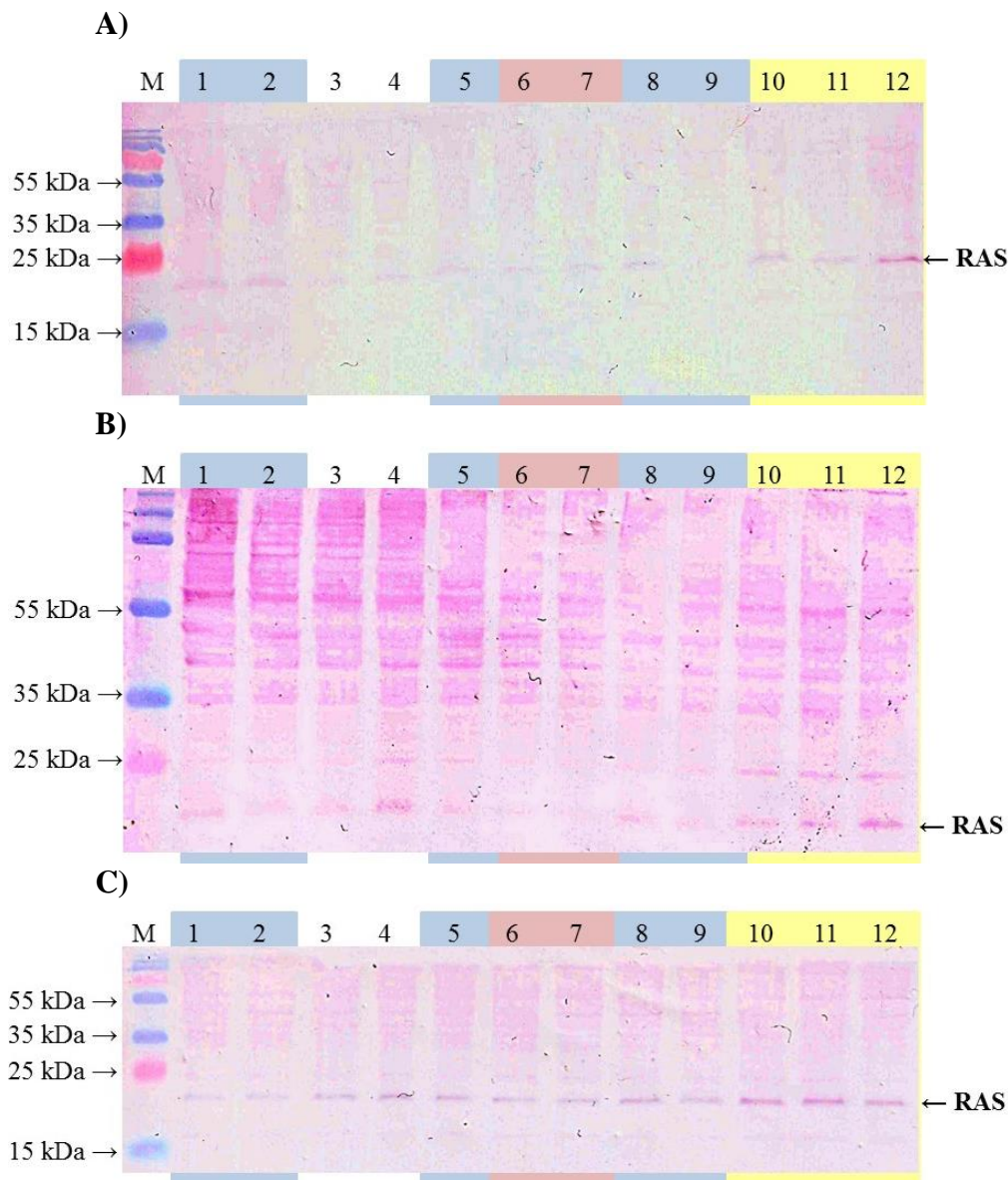
M – standard molekulových hmotností, 1 – UKF-NB-4, 2 - UKF-NB-4 + CDDP, 3 – UKF-NB-4^{CDDP}, 4 - UKF-NB-4^{CDDP} + CDDP, 5 – UKF-NB-4 + DOXO, 6 - UKF-NB-4^{DOXO}, 7 – UKF-NB-4^{DOXO} + DOXO, 8 - UKF-NB-4 + DMSO, 9 – UKF-NB-4 + ELLI, 10 - UKF-NB-4^{ELLI}, 11 - UKF-NB-4^{ELLI} + DMSO, 12 - UKF-NB-4^{ELLI} + ELLI; CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 µM).

4.1.3. Detekce hladiny RAS

Dalším studovaným proteinem, jehož exprese byla sledována po vystavení nádorových buněk cytostatikům metodou Western blot, byl protein RAS. Proteiny o celkové koncentraci 25 µg proteinů na jamku byly rozděleny v 16% polyakrylamidovém gelu a následně přeneseny na nitrocelulosevou membránu.

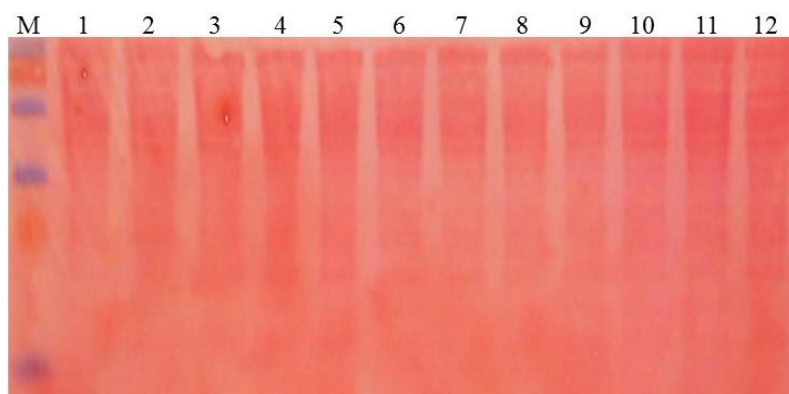
Na obrázku 13A, B a C, strana 50 nejsou viditelné výraznější rozdíly v expresi RAS proteinu (21 kDa) po 24, 48 respektive 72 hodinové inkubaci neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} s cisplatinou (1000 ng/ml), doxorubicinem (50 ng/ml) a ellipticinem (2,5 µM), respektive dimethylsulfoxidem (2,5% v/v). Mírně vyšší hladina RAS proteinu oproti parentální linii byla detekována u neuroblastomové linie rezistentní k ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} (podbarvena žlutě), a to zejména po 24 a 48 hodinové kultivaci s ellipticinem (2,5 µM). Srovnatelně zvýšenou expresi RAS vykazovala i kontrolní linie UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{ELLI} vystavená působení dimethylsulfoxidu po dobu 72 hodin.

Nitroceluloseová membrána byla nejdříve po přenosu proteinů z gelu na membránu barvena Ponceau. Obr. 14 na straně 51 ukazuje množství přenesených proteinů po 72 hodinové inkubaci sledovaných neuroblastomových buněčných linií s cytostatiky.



Obr. 13 – Detekce exprese proteinu RAS v buněčných liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} inkubovaných s příslušnými cytostatiky 24 hodin (A), 48 hodin (B) a 72 hodin (C).

M – standard molekulových hmotností, 1 – UKF-NB-4, 2 – UKF-NB-4 + CDDP, 3 – UKF-NB-4^{CDDP}, 4 – UKF-NB-4^{CDDP} + CDDP, 5 – UKF-NB-4 + DOXO, 6 – UKF-NB-4^{DOXO}, 7 – UKF-NB-4^{DOXO} + DOXO, 8 – UKF-NB-4 + DMSO, 9 – UKF-NB-4 + ELLI, 10 – UKF-NB-4^{ELLI}, 11 – UKF-NB-4^{ELLI} + DMSO, 12 – UKF-NB-4^{ELLI} + ELLI; CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 μ M).



Obr. 14 – Nitroceluloseová membrána barvená Ponceau – vizualizace přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na nitroceluloseovou membránu metodou Western blot. Po odmytí Ponceau byla tato membrána inkubována s primární protilátkou proti RAS a je uvedena na obrázku 12C.

M – standard molekulových hmotností, 1 – UKF-NB-4, 2 - UKF-NB-4 + CDDP, 3 – UKF-NB-4^{CDDP}, 4 - UKF-NB-4^{CDDP} + CDDP, 5 – UKF-NB-4 + DOXO, 6 - UKF-NB-4^{DOXO}, 7 – UKF-NB-4^{DOXO} + DOXO, 8 - UKF-NB-4 + DMSO, 9 – UKF-NB-4 + ELLI, 10 - UKF-NB-4^{ELLI}, 11 - UKF-NB-4^{ELLI} + DMSO, 12 - UKF-NB-4^{ELLI} + ELLI; CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 μ M).

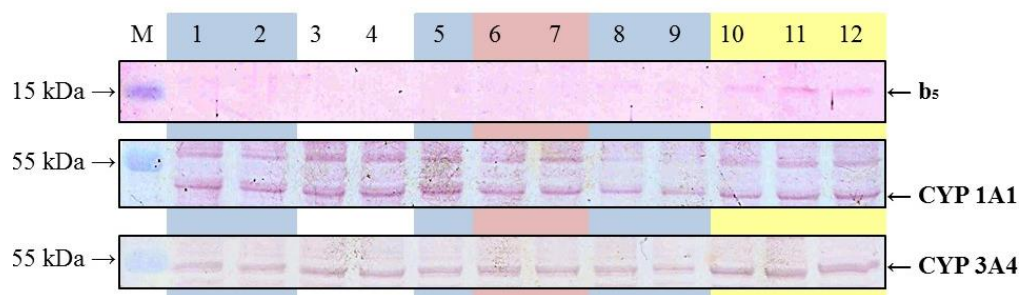
4.1.4. Detekce hladiny cytochromů P450 1A1, 2D6 a 3A4 a cytochromu b₅

Cytochromy P450 se významně podílejí na přeměně ellipticinu na jeho metabolity. Změny exprese CYP 1A1, 2D6 a 3A4 a cytochromu b₅ byly porovnávány u všech testovaných neuroblastomových linií. Vzorky neuroblastomových buněčných linií připravených podle kap. 3.2.4. na straně 35 byly nanášeny na polyakrylamidový gel v koncentraci 25 μ g proteinů na jamku.

Na obrázku 15 na straně 52 jsou znázorněny výsledky exprese po 72 hodinové inkubaci neuroblastomových linií s cytostatiky. Metodou Western blot nebyly detekovány výraznější změny exprese CYP 1A1, 3A4 ani cytochromu b₅ u neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} po inkubaci linií s jednotlivými studovanými cytostatiky 24, 48, ani 72 hodin. CYP 2D6 se nepodařilo detekovat vůbec.

Malý rozdíl v expresi cytochromu CYP3A4 je patrný mezi senzitivní linií UKF-NB-4 a rezistentní linií UKF-NB-4^{ELLI}, kde je množství tohoto cytochromu lehce zvýšené.

Odezvy cytochromu b₅ byly na hranici detekovatelnosti, avšak v porovnání s ostatními liniemi byla zaznamenána mírně zvýšená exprese cytochromu b₅ u linie UKF-NB-4^{ELLI} (podbarvena žlutě) již po 24 hodinové kultivaci.



Obr. 15 – Detekce exprese cytochromu b_5 a cytochromů P450 1A1 a 3A4 v buněčných liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} inkubovaných s příslušnými cytostatiky 72 hodin.

M – standard molekulových hmotností, 1 – UKF-NB-4, 2 – UKF-NB-4 + CDDP, 3 – UKF-NB-4^{CDDP}, 4 – UKF-NB-4^{CDDP} + CDDP, 5 – UKF-NB-4 + DOXO, 6 – UKF-NB-4^{DOXO}, 7 – UKF-NB-4^{DOXO} + DOXO, 8 – UKF-NB-4 + DMSO, 9 – UKF-NB-4 + ELLI, 10 – UKF-NB-4^{ELLI}, 11 – UKF-NB-4^{ELLI} + DMSO, 12 – UKF-NB-4^{ELLI} + ELLI; CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 μ M) b_5 – cytochrom b_5 , CYP 1A1 – cytochrom P450 1A1, 3A4 – cytochrom P450 3A4.

4.2. Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR)

Protože se metodou Western blot v neuroblastomových buněčných liniích nepodařilo detekovat cytochrom P450 2D6 ani výraznější rozdíly v expresi cytochromu P450 1A1 na proteinové úrovni, byla pozornost zaměřena na expresi vybraných studovaných molekul také na úrovni mRNA pomocí metody kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR).

Nejprve byla z neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} inkubovaných s příslušnými cytostatiky 48 a 72 hodin izolována RNA pomocí TRIzolTM (viz kapitola 3.2.9.).

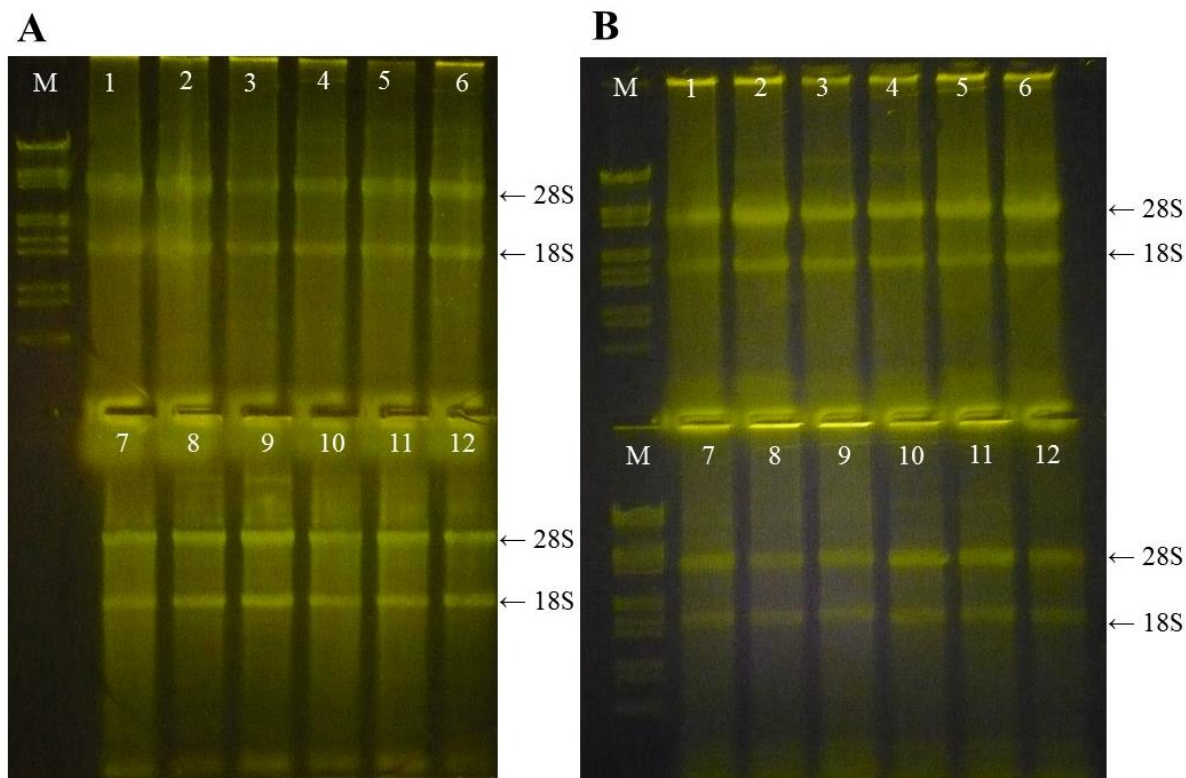
Čistota a koncentrace izolované RNA uvedené v Tab. 4 na straně 53 byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoVue Plus, GE Healthcare Life Science (Anglie). Čistota RNA většiny vzorků se pohybovala v požadovaném rozmezí 1,8 – 2.

Tab. 4 - Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace získané RNA.

CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 µM).

Kultivace s cytostatiky	Buněčná linie	Čistota RNA	Koncentrace RNA [µg·µl ⁻¹]
48 hodin	UKF-NB-4	1,77	0,360
	UKF-NB-4 + CDDP	1,78	0,374
	UKF-NB-4 + DOXO	1,83	0,325
	UKF-NB-4 + DMSO	1,82	0,387
	UKF-NB-4 + ELLI	1,75	0,252
	UKF-NB-4 ^{CDDP}	1,72	1,055
	UKF-NB-4 ^{CDDP} + CDDP	1,81	0,924
	UKF-NB-4 ^{DOXO}	1,78	0,479
	UKF-NB-4 ^{DOXO} + DOXO	1,86	0,421
	UKF-NB-4 ^{ELLI}	1,87	0,560
	UKF-NB-4 ^{ELLI} + DMSO	1,86	0,638
	UKF-NB-4 ^{ELLI} + ELLI	1,85	0,503
72 hodin	UKF-NB-4	1,83	0,508
	UKF-NB-4 + CDDP	1,80	0,459
	UKF-NB-4 + DOXO	1,81	0,432
	UKF-NB-4 + DMSO	1,85	0,664
	UKF-NB-4 + ELLI	1,88	0,294
	UKF-NB-4 ^{CDDP}	1,84	1,101
	UKF-NB-4 ^{CDDP} + CDDP	1,83	0,826
	UKF-NB-4 ^{DOXO}	1,82	0,672
	UKF-NB-4 ^{DOXO} + DOXO	1,84	0,700
	UKF-NB-4 ^{ELLI}	1,78	0,761
	UKF-NB-4 ^{ELLI} + DMSO	1,82	0,722
	UKF-NB-4 ^{ELLI} + ELLI	1,85	0,668

Kvalita izolované RNA byla ověřena také elektroforetickou migrací na agarosovém gelu. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 16, na agarosovém gelu jsou viditelné 2 proužky rRNA (28S a 18S), které značí nedegradovanou RNA a zároveň dokazují nepřítomnost kontaminace vzorků genomovou DNA.



Obr. 16 – Agarosová elektroforéza celkové RNA izolované z buněčných linií UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-IN-4^{ELLI} kultivovaných s příslušnými cytostatiky 48 hodin (A) a 72 hodin (B).

M – DNA λ -marker (Lamda DNA/EcoRI+HindIII Marker), 1 - UKF-NB-4^{CDDP}, 2 - UKF-NB-4^{CDDP} + CDDP, 3 - UKF-NB-4^{DOXO}, 4 - UKF-NB-4^{DOXO} + DOXO, 5 - UKF-IN-4^{ELLI}, 6 - UKF-IN-4^{ELLI} + DMSO, 7 - UKF-IN-4^{ELLI} + ELLI, 8 - UKF-NB-4, 9 - UKF-NB-4 + DMSO, 10 - UKF-NB-4 + DOXO, 11 - UKF-NB-4 + CDDP, 12 - UKF-NB-4 + ELLI. CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 μ M).

Izolovaná RNA byla v následujícím kroku přepsána reverzní transkripcí do komplementární DNA (cDNA), která byla s využitím genově specifických primerů použita jako templát pro RT-PCR.

Data byla vyhodnocena programem Rotor Gene 5 (Tab. 5 na straně 55) a zpracována dle kap. 3.2.12. (strana 41). Relativní kvantifikace exprese sledovaných genů ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) byla vyjádřena graficky.

Tab. 5 - Počet cyklů, při kterém fluorescence vzorku překročí prahovou hodnotu („threshold“), vyjádřený jako průměr C_T pro p53, pRb, H-RAS, cytochrom P450 2D6 a referenční gen B2M v lidských neuroblastomových liniích stanovený pomocí RT-PCR.

Vzorky byly kultivovány s příslušnými cytostatiky 48 a 72 hodin. Uvedené hodnoty C_T jsou vyjádřeny jako průměr ze dvou paralelních stanovení. CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 μ M).

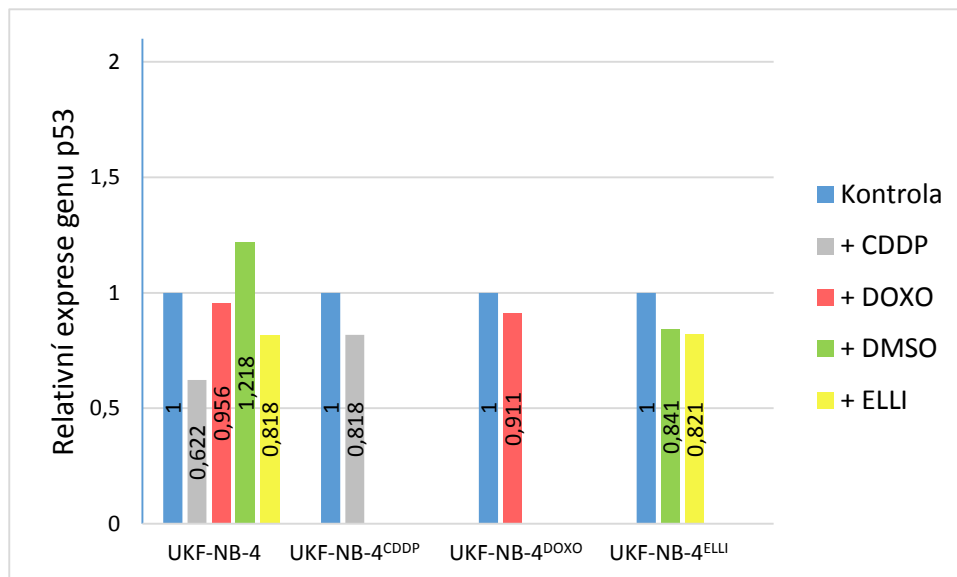
Buněčná linie	C_T (B2M)		C_T (p53)		C_T (pRb)		C_T (H-RAS)		C_T (2D6)	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
UKF-NB-4	18,93	18,58	21,32	21,55	23,82	24,24	21,58	22,30	28,57	24,49
UKF-NB-4 + CDDP	18,24	18,32	21,32	21,94	23,70	24,66	21,87	22,58	27,87	25,30
UKF-NB-4 + DOXO	18,18	18,55	20,64	21,82	23,34	24,29	21,85	22,30	28,26	25,15
UKF-NB-4 + DMSO	18,68	18,81	20,79	22,05	23,58	24,22	21,44	22,35	28,37	25,28
UKF-NB-4 + ELLI	18,19	18,43	20,88	21,68	23,43	23,72	21,08	22,10	27,74	24,24
UKF-NB-4 ^{CDDP}	18,42	19,46	19,50	21,08	22,71	24,20	20,92	22,24	28,12	24,51
UKF-NB-4 ^{CDDP} + CDDP	18,46	19,53	19,82	20,58	23,24	23,97	21,54	22,50	28,14	24,37
UKF-NB-4 ^{DOXO}	18,16	18,74	23,26	22,12	23,61	24,78	21,59	22,65	29,66	25,74
UKF-NB-4 ^{DOXO} + DOXO	18,11	18,68	21,35	22,24	23,56	24,74	21,23	22,74	30,00	25,73
UKF-NB-4 ^{ELLI}	18,40	18,45	19,67	20,92	23,58	24,99	21,72	22,24	27,72	24,65
UKF-NB-4 ^{ELLI} + DMSO	18,13	19,93	19,65	20,38	23,74	25,01	21,29	22,25	27,72	24,57
UKF-NB-4 ^{ELLI} + ELLI	18,37	18,90	19,93	21,40	23,58	24,70	21,14	22,39	27,85	24,88

4.2.1. Stanovení exprese genu p53

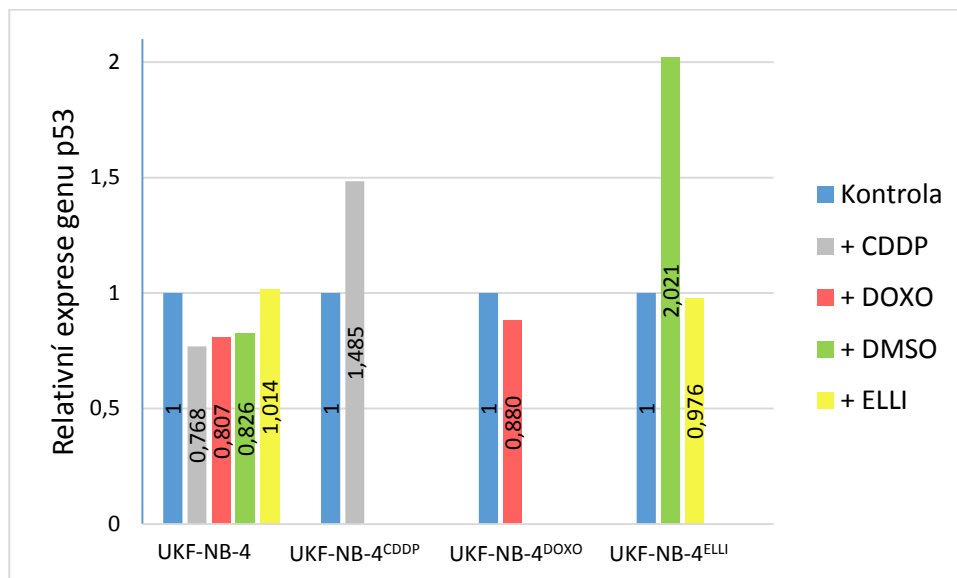
Z dat vyhodnocených na obrázku 17 na straně 56 vyplývá, že exprese genu p53 nebyla u senzitivní linie UKF-NB-4 kultivací s cisplatinou, doxorubicinem nebo ellipticinem zvýšena tak, jak tomu bylo na úrovni proteinů (Obr. 9, strana 45). Po 72 hodinové kultivaci s cisplatinou nebo doxorubicinem byla detekována dokonce nižší relativní exprese genu p53, ellipticin neměl na expresi tohoto genu vliv. Inkubace rezistentní neuroblastomové linie s doxorubicinem (UKF-NB-4^{DOXO}) nebo ellipticinem (UKF-NB-4^{ELLI}) s „udržovací“ koncentrací cytostatik neovlivnila expresi p53 na úrovni genu ani proteinu. Po 72 hodinové kultivaci rezistentní linie UKF-NB-4^{CDDP} s cisplatinou byla detekována vyšší exprese genu p53 (Obr. 17B, str. 56), zatímco na proteinové úrovni rozdíl v expresi proteinu p53 nebyl prokázán.

**Expresse genu p53 v neuroblastomových liniích
po kultivaci s příslušnými cytostatiky**

A) 48 hodin



B) 72 hodin



Obr. 17 - Relativní exprese genu p53 v lidských neuroblastomových liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} kultivovaných s příslušnými cytostatiky 48 hodin (A) a 72 hodin (B).

Kontrola – linie bez přidavku cytostatika, CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 μ M).

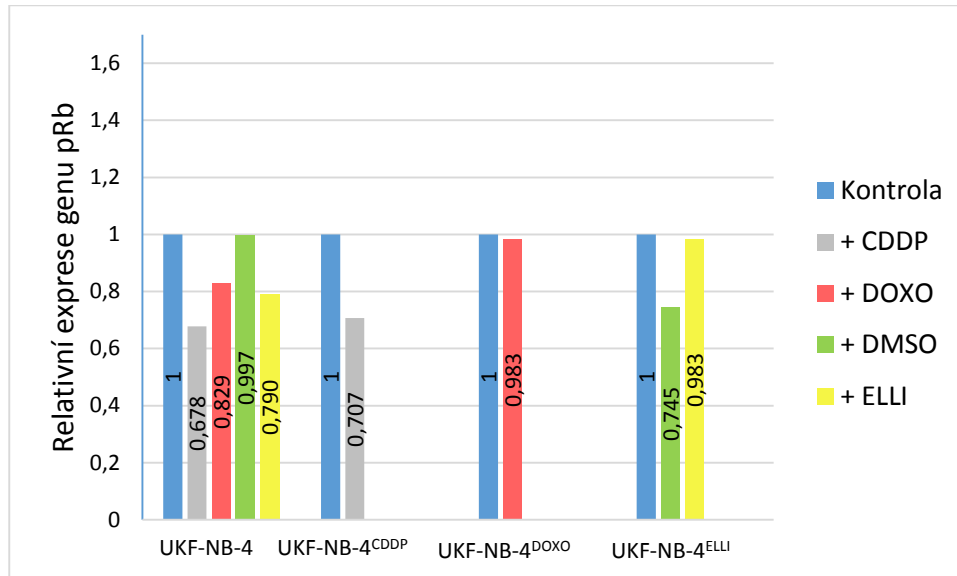
4.2.2. Stanovení exprese genu pRb

Metodou RT-PCR byly porovnávány také změny exprese genu pro retinoblastomový protein u neuroblastomových linií UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} po kultivaci s příslušnými cytostatiky a dimethylsulfoxidem 48 a 72 hodin (Obr. 18 na straně 58).

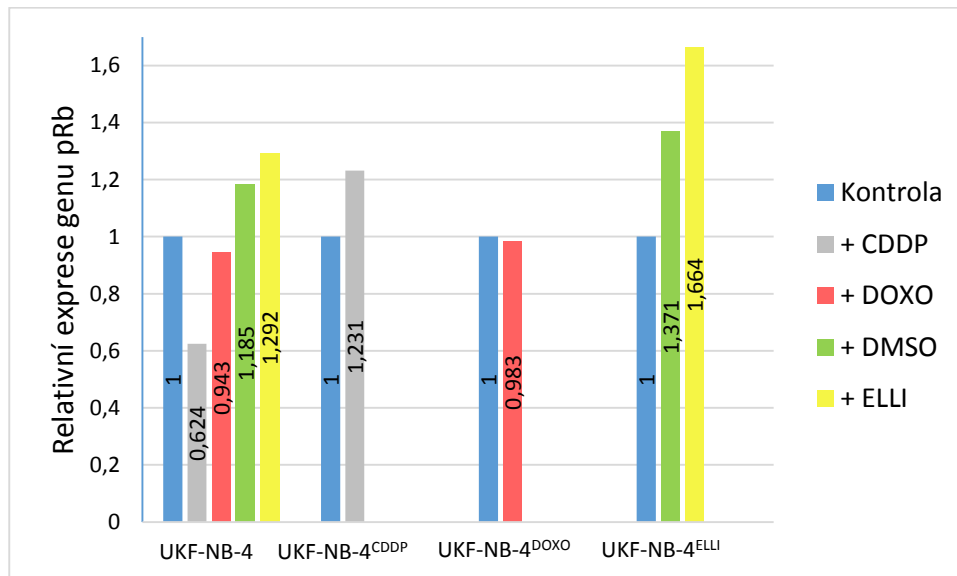
Po 48 hodinovém působení cytostatik na senzitivní linii UKF-NB-4 (Obr. 18A, strana 58) byly patrné nižší exprese pRb ve vzorcích vystavených cisplatině (1000 ng/ml), doxorubicinu (50 ng/ml) a ellipticinu (2,5 μ M). Tyto výsledky odpovídají změnám exprese pRb na proteinové úrovni detekované po 72 hodinové inkubaci senzitivní linie s cytostatiky. 72 hodinová kultivace linie UKF-NB-4 s cisplatinou způsobila stejně jako 48 hodinová inkubace sníženou expresi genu pRb v této linii; 72 hodinové působení doxorubicinu nemělo vliv na změnu exprese genu u senzitivní linie, naopak ellipticin vyvolal vyšší expresi genu oproti parentální linii (Obr. 18B na straně 58). V rezistentní linii UKF-NB-4^{CDDP} vystavené 72 hodinovému působení cisplatinu byla detekována vyšší hladina genu pRb, působení doxorubicinu na linii UKF-NB-4^{DOXO} nezpůsobilo změnu relativní exprese genu. Přestože metodou Western blot byla detekována snížená exprese proteinu pRb po 72 hodinovém působení ellipticinu na rezistentní linii UKF-NB-4^{ELLI}, při porovnávání exprese na úrovni mRNA byla u této linie patrná vyšší hladina genu pRb.

**Expresse genu pRb v neuroblastomových liniích
po kultivaci s příslušnými cytostatiky**

A) 48 hodin



B) 72 hodin



Obr. 18 - Relativní exprese genu pRb v lidských neuroblastomových liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} kultivovaných s příslušnými cytostatiky 48 hodin (A) a 72 hodin (B).

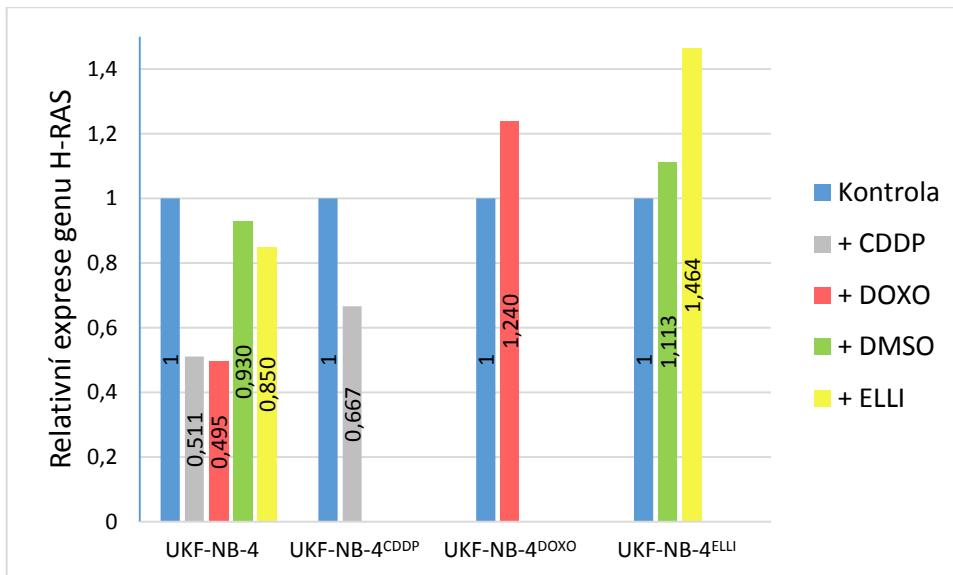
Kontrola – linie bez přidavku cytostatika, CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 µM).

4.2.3. Stanovení exprese genu H-RAS

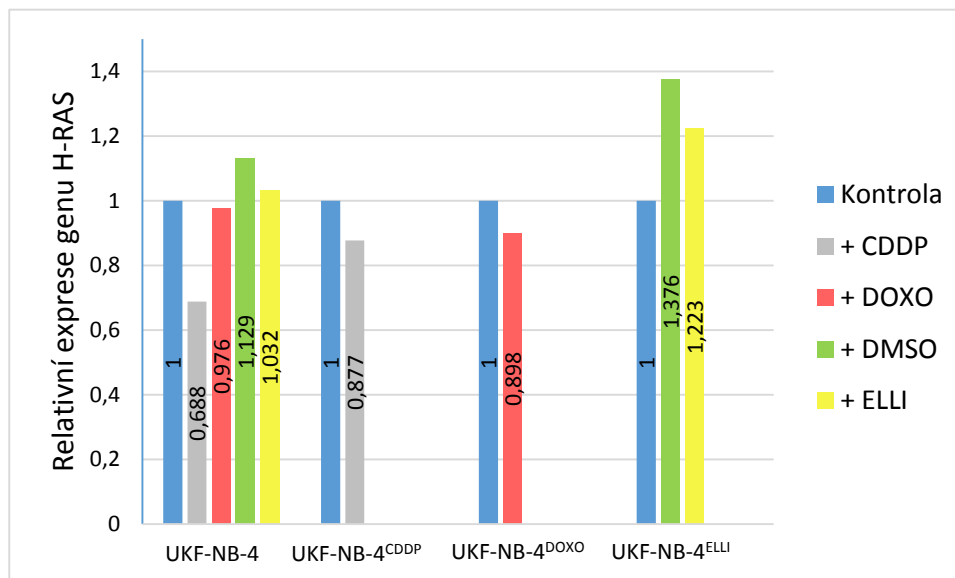
Z obrázku 19 na straně 60 je patrné, že 48 nebo 72 hodinová inkubace neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} s cisplatinou o koncentraci 1000 ng/ml snižuje expresi genu H-RAS. U senzitivní linie UKF-NB-4 byla též zaznamenána nižší exprese genu po 48 hodinové inkubaci s doxorubicinem (50 ng/ml). U rezistentní linie UKF-NB-4^{ELLI} byla detekována mírně vyšší exprese genu H-RAS po 48 a 72 hodinové kultivaci s ellipticinem (2,5 μ M), respektive dimethylsulfoxidem (2,5% v/v).

**Expresse genu H-RAS v neuroblastomových liniích
po kultivaci s příslušnými cytostatiky**

A) 48 hodin



B) 72 hodin



Obr. 19 - Relativní exprese genu H-RAS v lidských neuroblastomových liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} kultivovaných s příslušnými cytostatiky 48 hodin (A) a 72 hodin (B).

Kontrola – linie bez přidavku cytostatika, CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 µM).

4.2.4. Stanovení exprese genu CYP 1A1

Metodou kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase se nepodařilo detekovat změny exprese genu CYP 1A1 v lidských neuroblastomových liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} vystavených působení cytostatik cisplatiny (1000 ng/ml), doxorubicinu (50 ng/ml) a ellipticinu (2,5 µM) pravděpodobně z důvodu velmi nízké koncentrace genu CYP 1A1 v testovaných vzorcích.

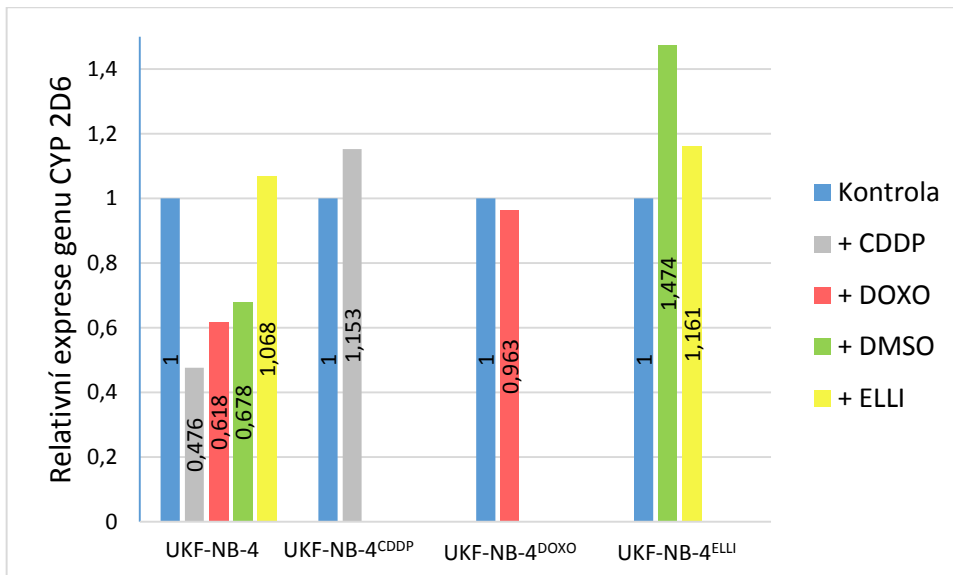
4.2.5. Stanovení exprese genu CYP 2D6

Metoda RT-PCR byla použita také pro relativní kvantifikaci změn exprese genu CYP 2D6 ve vzorcích neuroblastomových linií kultivovaných s příslušnými cytostatiky 48 a 72 hodin dle kap. 3.2.4.

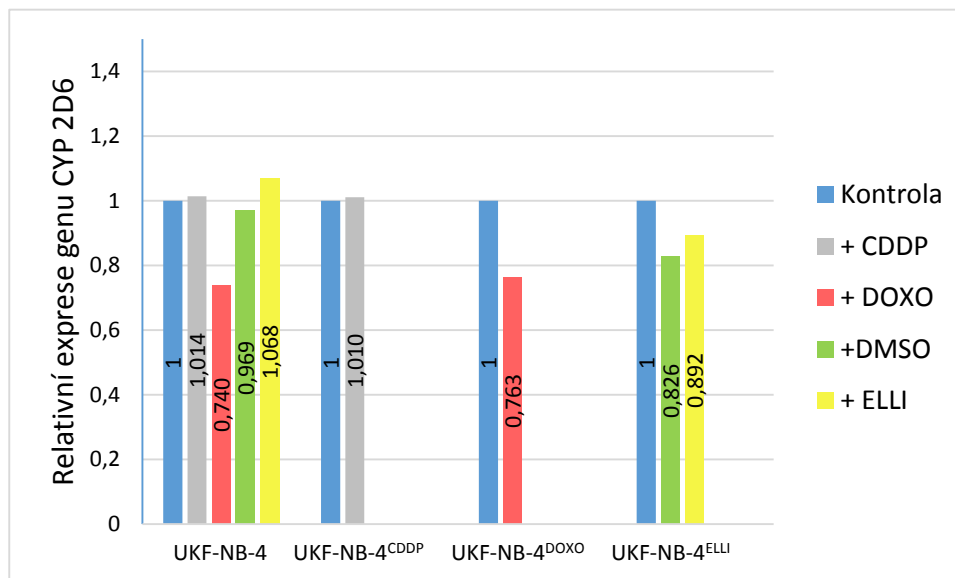
Snížená exprese CYP2D6 na genové úrovni byla detekována v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 po 48 hodinové kultivaci s cisplatinou nebo s doxorubicinem (Obr. 20A, strana 62). Po delším vystavení (72 hodin) testovaných buněčných linií cytostatikům byla detekována nižší exprese CYP 2D6 pouze v buněčných liniích vystavených doxorubicinu o koncentraci 50 ng/ml (UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO}, Obr. 20B na straně 62).

**Expresse genu CYP 2D6 v neuroblastomových liniích
po kultivaci s příslušnými cytostatiky**

A) 48 hodin



B) 72 hodin



Obr. 20 - Relativní exprese genu CYP 2D6 v lidských neuroblastomových liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} kultivovaných s příslušnými cytostatiky 48 hodin (A) a 72 hodin (B).

Kontrola – linie bez přidavku cytostatika, CDDP – cisplatina (1000 ng/ml), DMSO – dimethylsulfoxid (2,5% v/v), DOXO – doxorubicin (50 ng/ml), ELLI – ellipticin (2,5 µM).

5. Diskuze

Proces přeměny zdravé buňky v nádorovou je nesmírně složitý, přesto je rakovina stále jednou z nejčastějších příčin úmrtí ⁴. Právě proto je výzkum maligních onemocnění již dlouhou dobu v popředí zájmu vědců a díky pokrokům vedoucím ke stále se prohlubujícímu pochopení mechanismů karcinogeneze počty úmrtí způsobené maligním onemocněním stagnují nebo dokonce mírně klesají, i když pacientů s rakovinou přibývá. Přestože se rakovina objevuje u jedinců každého věku, počet dětí diagnostikovaných s nádorovým bujením není velký ^{2,5,6}.

Nicméně i přes veškeré pokroky v onkologické diagnostice a terapii je chemoterapeutická léčba komplikována vznikem rezistence k podávaným cytostatikům. Právě odhalení klíčových míst vzniku rezistence je velmi důležité pro usnadnění této léčby a zlepšení prognózy pacientů.

V této diplomové práci byla experimentálně porovnávána exprese proteinů p53, pRb, RAS a cytochromů P450 1A1, 2D6, 3A4, a cytochromu b₅ u lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4, založené z rekurentních metastáz kostní dřeně neuroblastomu vysokého rizika s MYCN amplifikací, delecí 1p a vyznačující se rezistencí na léčiva ⁵⁷, a od ní odvozených linií rezistentních k cisplatině (UKF-NB-4^{CDDP}), doxorubicinu (UKF-NB-4^{DOXO}) nebo ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}) po vystavení buněk těmto cytostatikům, konkrétně cisplatině (1000 ng/ml), doxorubicinu (50 ng/ml), respektive ellipticinu (2,5 μM). Rozdílná exprese proteinů, které se mohou podílet na vzniku chemorezistence, v parentální linii a od ní odvozených rezistentních linií může přispět k vysvětlení špatné odpovědi pacientů vůči podávaným cytostatikům.

Protein p53 hraje nezastupitelnou roli při buněčné obraně proti maligní transformaci a progresi díky schopnosti zastavit buněčný cyklus v případě, že je buňka poškozena. V buňkách je protein p53 přítomen ve velmi malém množství díky jeho neustálé syntéze a odbourávání. Při poškození DNA však jeho množství výrazně stoupá, protože je omezena jeho degradace ^{15,95}. Tento protein je mutován právě u většiny nádorových onemocnění ⁹³. Množství proteinu p53 v testovaných lidských neuroblastomových buněčných liniích bylo i při aplikaci 75 μg proteinů na jamku na hranici detekovatelnosti. Vyšší hladiny proteinu p53 byly detekovány až po 72 hodinové kultivaci senzitivní neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 s cisplatinou o koncentraci 1000 ng/ml, doxorubicinem o koncentraci 50 ng/ml nebo 2,5 μM ellipticinem (Obr. 9C, str. 45). Kultivace rezistentních neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4^{CDDP}, UKF-NB-4^{DOXO} nebo UKF-NB-4^{ELLI} za stejných

podmínek neměla na hladinu proteinu p53 vliv. Takto nízké koncentrace příslušných cytostatik nejsou pro rezistentní neuroblastomové buněčné linie toxické. Dlouhodobou kultivací s jednotlivými cytostatiky se jim buněčné linie přizpůsobily a tyto koncentrace již nevyvolávají odpověď buněk zvýšením hladiny proteinu p53.

Zvýšená hladina proteinu p53 po 72 hodinové kultivaci senzitivní neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 s cytostatiky je pravděpodobně způsobená blokováním jeho odbourávání, protože relativní kvantifikací exprese samotného genu p53 byly zaznamenány nižší hladiny p53 po inkubaci buněk s cisplatinou nebo doxorubicinem, zatímco působení ellipticinu množství p53 neovlivnilo.

Jiný protein, který je nepostradatelný pro správné buněčné pochody je retinoblastomový protein. Je důležitým negativním regulátorem buněčného cyklu ovlivňujícím přechod z G₁-fáze do S-fáze. Dokud je retinoblastomový protein hypofosforylovaný, nevstupuje buňka do S-fáze buněčného cyklu. V nádorových buňkách bývá gen pro syntézu retinoblastomového proteinu inaktivní, což způsobuje neustálou syntézu DNA a buněčné dělení^{98,99}. Cisplatina, doxorubicin i ellipticin snižovaly hladinu fosforylovaného retinoblastomového proteinu v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 po 72 hodinové kultivaci (Obr. 11C na straně 38). Buňky tak mohly mít možnost před vstupem do S-fáze opravit poškozenou DNA. Nižší hladiny pRb u senzitivní linie vystavené působení cytostatik byla potvrzena také na úrovni genové exprese, v tomto případě již po 48 hodinové inkubaci buněk s cytostatiky (Obr. 18A, strana 58). Nižší hladina pRb byla zaznamenána i po 72 hodinovém vystavení neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4^{ELLI} 2,5 μM ellipticinu. Cisplatina ani doxorubicin neměly vliv na množství pRb v rezistentních liniích UKF-NB-4^{CDDP}, respektive UKF-NB-4^{DOXO} vliv. Tyto buněčné linie se daným cytostatikům mohly přizpůsobit právě potlačením správné funkce retinoblastomového proteinu.

Dalším studovaným proteinem byl protein RAS. Patří mezi proteiny s GTPasovou aktivitou, které regulují buněčnou proliferaci. RAS spolu s p53 je jedním z nejčastěji mutovaných proteinů vyskytujících se u solidních nádorů^{2,100}. Protein RAS byl metodou Western blot sice detekován, ale nebyly však patrné výraznější rozdíly v expresi mezi jednotlivými vzorky v rámci jedné linie (Obr. 13C na straně 50); nicméně metodou RT-PCR byly zaznamenány snížené hladiny exprese H-RAS po 48 hodinovém působení cisplatinou nebo doxorubicinu na senzitivní linii UKF-NB-4. Při porovnání linií mezi sebou byla metodou Western blot detekována mírně vyšší hladina RAS v rezistentní linii UKF-NB-4^{ELLI} vystavené působení ellipticinu, respektive dimethylsulfoxidu 24 a 48 hodin. Tato tendence byla částečně potvrzena i na genové úrovni relativní kvantifikací, kdy byly

zaznamenány vyšší exprese genu H-RAS v linii UKF-NB-4^{ELLI} vystavené působení ellipticinu, respektive dimethylsulfoxidu 48 a 72 hodin v porovnání s kontrolní linií (Obr. 19B na straně 60).

Cytochromy P450 jsou enzymy, které se podílejí na metabolismu cizorodých látek. CYP 1A1 oxiduje ellipticin převážně na detoxifikační produkty, cytotoxické produkty vznikají při metabolismu ellipticinu CYP 2D6 a 3A4. Cytochrom b₅ ovlivňuje oxidaci ellipticinu CYP 1A1 ve prospěch aktivačních, tedy cytotoxických metabolitů, v případě CYP 3A4 je stimulována tvorba 9-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu^{59,61,82–84}. Přestože jsou tyto enzymy spojovány zejména s metabolismem ellipticinu, byla jejich exprese porovnávána i u linií vystavených působení cisplatiny a doxorubicinu. Výsledky Western blotu neprokázaly větší rozdíly v expresi CYP 1A1 a 3A4 ani v porovnání jednotlivých linií mezi sebou. Pouze v případě cytochromu b₅ byla znatelná jeho větší exprese právě u rezistentní linie UKF-NB-4^{ELLI} ať už v případě kontroly, tak také u vzorků vystavených působení ellipticinu, respektive dimethylsulfoxidu. CYP 2D6 se na proteinové úrovni nepodařilo detekovat vůbec. Právě z důvodu nejednoznačných výsledků Western blotu byla exprese CYP 1A1 a 2D6 studována také na úrovni mRNA metodou RT-PCR. Rozdíly v genové expresi CYP 1A1 nebylo možné pomocí RT-PCR stanovit pravděpodobně z důvodu velmi nízké koncentrace genu v testovaných buněčných liniích. Z výsledků relativní kvantifikace exprese genu pro CYP 2D6 bylo patrné, že 48 hodinová kultivace UKF-NB-4 s cisplatinou nebo s doxorubicinem snížila hladinu genu CYP 2D6.

Získané výsledky v předkládané diplomové práci byly v souladu s předpokládaným vlivem cytostatik na neuroblastomové buněčné linie. Nicméně by získané informace mohly být doplněny ještě o komplexní studie zaměřené na další mechanismy zodpovědné za vznik chemorezistence.

6. Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývala vlivem cytostatik cisplatiny, doxorubicinu a ellipticinu na expresi proteinů, které se mohou podílet na vzniku rezistence u buněčné linie UKF-NB-4 a od ní odvozené linie rezistentní k cisplatině UKF-NB-4^{CDDP}, doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO} a ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI}.

Výsledky dosažené v této diplomové práci lze shrnout následovně:

- Metodou Western blot byla detekována indukce exprese proteinu p53 u senzitivní linie UKF-NB-4 vystavené působení cisplatiny, ellipticinu a doxorubicinu po dobu 72 hodin. Metodou RT-PCR byly stanoveny nižší hladiny p53 na úrovni genové exprese v senzitivní linii UKF-NB-4 po 72 hodinovém vystavení buněk cisplatině a doxorubicinu, působení ellipticinu expresi genu p53 v této linii neovlivnilo.
- Vystavením buněčné linie UKF-NB-4 působení cisplatiny, doxorubicinu a ellipticinu po dobu 72 hodin došlo ke snížení exprese retinoblastomového proteinu v těchto liniích, na úrovni mRNA byly detekovány také nižší hladiny genu pRb po 48 hodinové inkubaci s příslušnými cytostatiky.
- Nebyly detekovány změny exprese proteinu RAS, cytochromů P450 1A1, 2D6 a 3A4 a cytochromu b₅ na proteinové úrovni pomocí metody Western blot. Metodou RT-PCR byly zaznamenány snížené hladiny genu H-RAS a cytochromu P450 2D6 po 48 hodinové kultivaci s cisplatinou nebo doxorubicinem.

Literatura

1. Teicher, B. A., Linehan, W. M., Helman, L. J. *Clin. Cancer Res.* **18**, 5537–45 (2012).
2. Davidoff, A. M. *Semin. Pediatr. Surg.* **19**, 225–33 (2010).
3. World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: World Health Organization; 2008.
4. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. *CA Cancer. J. Clin.* **61**, 69–90 (2011).
5. Koutecký, J. *Klinická onkologie I.* (Riopress, 2004).
6. Young, J. L. J., Ries, L. G., Silverberg, E., Horm, J. W., Miller, R. W. *Cancer.* **58**, 598–602 (1986).
7. Wright, M., Bryans, A., Gray, K., Skinner, L., Verhoeve, *Leuk. Res. Treat.* **ID 592395**, (2013).
8. Pui, C. H., Gaijar, A. J., Kane, J. R., Qaddoumi, I. A., Pappo, A. S. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 540–549 (2011).
9. Klener, P., Klener, P. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii.* (Grada Publishing, 2010).
10. Vokurka, M. *Praktický slovník medicíny.* (Maxdorf, 1994).
11. Klener, P. *Protinádorová chemoterapie.* (Galén, 1996).
12. Stratil, P., Kubáň, V. *Chem. List.* **98**, 379–387 (2004).
13. Oliveira, P. A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz, L. F., Lopes, C. *An. Acad. Bras. Cienc.* **79**, 593–616 (2007).
14. Barrett, J. C., Wiseman, R. W. *Environ. Heal. Perspect.* **76**, 65–70 (1987).
15. Masopust, J., Průša, R. *Patobiochemie buňky.* (Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003).
16. Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., Maley, C. C. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 924–935 (2006).
17. Hanahan, D., Weinberg, R. A. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
18. Hanahan, D., Weinberg, R. A. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
19. Lemmon, M. A., Schlessinger, J. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).

20. Bryan, T. M., Cech, T. R. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 318–324 (1999).
21. Erenpreisa, J., Cragg, M. S. *Cancer Cell Int.* **13**, 92 (2013).
22. Sporn, M. B. *Lancet.* **347**, 1377–1381 (1996).
23. Hsu, P. P., Sabatini, D. M. *Cell* **134**, 703–707 (2008).
24. Davidoff, A. M. *Semin. Pediatr. Surg.* **21**, 2–14 (2012).
25. Bottino, C., Dondero, A., Bellora, F., Moretta, L., Locatelli, F., Pistoia, V., Moretta, A., Castriconi, R. *Front. Immunol.* **5**, 56 (2014).
26. Brodeur, G. M. *Nat. Rev. Cancer.* **3**, 203–216 (2003).
27. Heck, J. E., Ritz, B., Hung, R. J., Hashibe, M., Boffetta, P. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **23**, 125–143 (2009).
28. Boráňová, S., Žáčik, M. *Pediatr. praxi* **13**, 335–337 (2012).
29. Pritchard, J., Hickman, J. A. *Lancet.* **344**, 869–870 (1994).
30. Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R., Cohn, S. L. *Lancet* **369**, 2106–2120 (2007).
31. Maris, J. M., Weiss, M. J., Mosse, Y., Hii, G., Guo, Ch., White, P. S., Hogarty, M. D., Mirensky, T., Brodeur, G. M., Rebbeck, T. R., Urbanek, M., Shutsterman, S. *Cancer Res.* **62**, 6651–6658 (2002).
32. Mossé, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., Laguaglia, M. J., Sennett, R., Lynch, J. E., Perri, P., Laureys, G., Speleman, F., Kim, C., Hou, C., Hakonarson, H., Torkamani, A., Schork, N. J., Brodeur, G. M., Tonini, G. P., Rappaport, E., Devoto, M., Maris, J. M. *Nature* **455**, 930–935 (2008).
33. Maris, J. M. *N. Engl. J. Med.* **362**, 2202–2211 (2010).
34. Slamon, D. J., Boone, T. C., Seeger, R. C., Keith, D. E., Chazin, V., Lee, H. C., Souza, L. M. *Science.* **232**, 786–772 (1986).
35. Westermarck, U. K., Wilhelm, M., Frenzel, A., Henriksson, M. A. *Semin. Cancer. Biol.* **21**, 256–266 (2011).
36. Bell, E., Chen, L., Liu, T., Marshall, G. M., Lunec, J., Tweddle, D. A. *Cancer. Lett.* **293**, 144–157 (2010).
37. Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M. *Science.* **224**, 1124–1124 (1984).
38. Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, R., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y., Hammond, D. *N. Engl. J. Med.* **313**, 1111–1116 (1985).

39. Villamón, E., Berbegall, A. P., Pigueras, M., Tadeo, I., Castel, V., Djos, A., Martinsson, T., Navarro, S., Noguera, R. *PLoS One* **8**, e53740 (2013).
40. Attiyeh, E. F., London, W. B., Mossé, Y. P., Wang, Q., Winter, C., Khazi, D., McGrady, P. W., Seeger, R. C., Look, A. T., Shimanda, H., Brodeur, G. M., Cohn, S. L., Matthay, K. K., Maris, J. M. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2243–2253 (2005).
41. Hempstead, B. L. *Curr. Alzheimer Res.* **3**, 19–24 (2006).
42. Reichardt, L. F. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **361**, 1545–1564 (2006).
43. Carr-Wilkinson, J., O'Toole, K., Wood, K. M., Challen, C. C., Baker, A. G., Board, J. R., Evans, L., Cole, M., Cheung, N. K., Boos, J., Köhler, G., Leuschner, I., Pearson, A. D., Lunec, J., Tweddle, D. A. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1108–1118 (2010).
44. Monclair, T., Brodeur, G. M., Ambros, P. F., Brisse, H. J., Cecchetto, G., Holmes, K., Kaneko, M., London, W. B., Matthay, K. K., Nuchtern, J. G., Schweinitz, D., Simon, T., Cohn, S. L., Pearson, A. D. *J. Clin. Oncol.* **27**, 298–303 (2009).
45. Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Barrett, A., Berthold, F., Castleberry, R. P., D'Angio, G., Bernardi, B., Evans, A. E., Favort, M., Freeman, A. I., Haase, G., Hartmann, O., Hayes, F. A., Helson, L., Kemshead, J., Lampert, F., Ninane, J., Ohkawa, H., Philip, T., Pinkerton, C. R., Pritchard, J., Sawada, T., Siegel, S., Smith, E. I., Tsuchida, Y., Voute, P. A. *J. Clin. Oncol.* **6**, 1874–1881 (1988).
46. Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L. T., Castel, V., Castleberry, R. P., Bernardi, B., Evans, A. E., Favort, M., Hedborg, F., Kaneko, M., Kemshead, J., Lampert, F., Lee, R. E. J., Look, A. T., Pearson, A. D. J., Philip, T., Roald, B., Sawada, T., Seeger, R. C., Tsuchida, Y., Voute, P. A. *J. Clin. Oncol.* **11**, 1466–1477 (1993).
47. Evans, A. E., D'Angio, G., Randolph, J. *Cancer* **27**, 374–378 (1971).
48. Mazánek, P., Bajčiová, V., Šterba, J., Kuglík, P., Veselská, R. *Onkológia* **3**, 257–261 (2008).
49. Katzenstein, H. M., Rademaker, A. W., Senger, C., Salwen, H. R., Nguyen, N. N., Thorner, P. S., Litsas, L., Cohn, S. L. *Clin. Cancer Res.* **5**, 4273–4278 (1999).
50. Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G., Maurer, B. J. *Cancer. Lett.* **197**, 185–192 (2003).
51. Matthay, K. K., DeSantes, K., Hasegawa, B., Huberty, J., Hattner, R. S., Abilin, A., Reynolds, C. P., Seeger, R. C., Weinberg, V. K., Prince, D. *J. Clin. Oncol.* **16**, 229–236 (1998).
52. Klener, P. *Klin. Onkol.* **6**, 241–248 (2003).
53. Martínková, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. (Grada Publishing, 2007).

54. Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L. *Barevný atlas farmakologie*. (Grada Publishing, 2007).
55. Hynie, S. *Farmakologie v kostce*. (Triton, 2001).
56. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie*. (Grada Publishing, 200AD).
57. Procházka, P., Libra, A., Zemanová, Z., Hřebacková, J., Poljaková, J., Hraběta, J., Bunčec, M., Stiborová, M., Eckschlager, T. *Cancer Sci.* **103**, 334–341 (2012).
58. Ma, W., Lu, S., Pan, P., Sadatmousavi, P., Yuan, Y., Chen, P. *PLoS One* **7**, e43684 (2012).
59. Stiborová, M., Rupertová, M., Schmeiser, H. H., Frei, E. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **150**, 13–23 (2006).
60. Stiborová, M., Breuer, A., Aimová, D., Stiborová-Rupertová, M., Frei, E. *Int. J. Cancer.* **107**, 885–890 (2003).
61. Stiborová, M., Bieler, C. A., Wiessler, M., Frei, E. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1675–1684 (2001).
62. Auclair, C. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 1–14 (1987).
63. Kuo, P. L., Hsu, Y. L., Chang, C. H., Lin, C. C. *Cancer Lett.* **223**, 293–301 (2004).
64. Poljaková, J., Eckschlager, T., Hraběta, J., Hřebacková, J., Smutný, S., Frei, E., Martínek, V., Kizek, R., Stiborová, M. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1466–1479 (2009).
65. Froelich-Ammon, S. J., Patchan, M. W., Osheroff, N., Thompson, R. B. *J. Biol. Chem.* **270**, 14998–15004 (1995).
66. Fossé, P., René, B., Charra, M., Paoletti, C., Saucier, J. M. *Mol. Pharmacol.* **42**, 590–595 (1992).
67. Ohashi, M., Sugikawa, E., Nakanishi, N. *Jpn. J. Cancer. Res.* **86**, 819–827 (1995).
68. Schwaller, M. A., Allard, B., Lescot, E., Moreau, F. *J. Biol. Chem.* **270**, 22709–22713 (1995).
69. Poljaková, J., Forsterová, K., Šulc, M., Frei, E., Stiborová, M. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **149**, 449–453 (2005).
70. Blažková, I., Dostálová, S., Šmerková, K., Ryvolová, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborová, M., Kizek, R. *CHEMagazín* **12**, 8–10 (2012).
71. Kostrzewa-Nowak, D., Paine, M. J., Wolf, C. R., Tarasiuk, J. *Br. J. Cancer.* **93**, 89–97 (2005).

72. Gewirtz, D. A. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 727–741 (1999).
73. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. *Pharmacol. Rev.* **56**, 185–229 (2004).
74. Nitiss, J. L. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 338–350 (2009).
75. Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C. R. *J. Pharm. Pharmacol.* **65**, 157–170 (2013).
76. Agudelo, D., Bourassa, P., Beauregard, M., Bérubé, G., Tajmir-Riahi, H. A. *PLoS One* **8**, e69248 (2013).
77. Menna, P., Paz, O. G., Chello, M., Covino, E., Salvatorelli, E., Minotti, G. *Expert. Opin. Drug. Saf.* **11**, 21–36 (2012).
78. Hanigan, M. H., Devarajan, P. *Cancer. Ther.* **1**, 47–61 (2003).
79. Florea, A. M., Büsselberg, D. *Cancers (Basel).* **3**, 1351–1371 (2011).
80. Raguz, S., Yagüe, E. *Br. J. Cancer.* **99**, 387–391 (2008).
81. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. *Chem. List.* **93**, 229–237 (1999).
82. Aimová, D., Svobodová, L., Kotrbová, V., Mrázová, B., Hodek, P., Hudeček, J., Václavíková, R., Frei, E., Stiborová, M. *Drug. Metab. Dispos.* **35**, 1926–1934 (2007).
83. Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Černá, V., Rupertová, M., Martínek, V., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 1075–1085 (2012).
84. Stiborová, M., Poljaková, J., Martínková, E., Bořek-Dohalská, L., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E. *Interdiscip. Toxicol.* **4**, 98–105 (2011).
85. Schenkman, J. B., Jansson, I. *Pharmacol. Ther.* **97**, 139–152 (2003).
86. Vergères, G., Waskell, L. *Biochimie.* **77**, 604–620 (1995).
87. Kotrbová, V., Aimová, D., Ingr, M., Bořek-Dohalská, L., Martínek, V., Stiborová, M. *Protein. Expr. Purif.* **66**, 203–209 (2009).
88. Zhang, H., Myshkin, E., Waskell, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 499–506 (2005).
89. Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, F. P., Shimada, T., Nakajima, M., Yokoi, T. *Protein. Expr. Purif.* **24**, 329–337 (2002).
90. Porter, T. D. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **16**, 311–316 (2002).
91. Stiborová, M., Poljaková, J., Martínková, E., Ulrichová, J., Simánek, V., Dvořák, Z., Frei, E. *Toxicology* **302**, 233–241 (2012).

92. Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 669–680 (2011).
93. Sionov, R. V., Haupt, Y. *Oncogene*. **18**, 6145–6157 (1999).
94. Tweddle, D. A., Malcolm, A. J., Cole, M., Pearson, A. D., Lunec, J. *Am. J. Pathol.* **158**, 2067–2077 (2001).
95. Bálint, É., Vousden, K. H. *Br. J. Cancer*. **85**, 1813–1823 (2001).
96. Van Maerken, T., Rihani, A., Dreidax, D., De Clercq, S., Yigit, N., Marine, J. C., Westermann, F., De Paepe, A., Vandesompele, J., Speleman, F. *Mol. Cancer. Ther.* **10**, 983–993 (2011).
97. Xue, C., Haber, M., Flemming, C., Marshall, G. M., Lock, R. B., MacKenzie, K. L., Gurova, K. V., Norris, M. D., Gudkov, A. V. *Cancer Res.* **67**, 10351–10360 (2007).
98. Giacinti, C., Giordano, A. *Oncogene*. **25**, 5220–5227 (2006).
99. Weinberg, R. A. *Cell* **81**, 323–330 (1995).
100. Klener, P., Klener, P. *Principy systémové protinádorové léčby*. (Grada Publishing, 2013).
101. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, E. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
102. Laemmli, U. K. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
103. Whitaker, G., Lunte, C. E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**, 490–496 (2010).
104. Han, S. J., Ahn, T. K., Choi, H. S., Shin, J. N., Piya, S., Kim, T. H. *J. Gynecol. Oncol.* **20**, 113–116 (2009).
105. Stiborová, M., Rupertová, M., Frei, E. *Biochem. Biophys. Acta.* **1814**, 175–185 (2011).
106. Koolman, J., Röhm, K.-H. *Barevný atlas biochemie - Překlad 4. vydání*. (Grada Publishing, 2012).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka